

Untersuchungen zum Einfluss der Hepatitis C-Virus-Koinfektion  
auf die Immunrekonstitution bei HIV-positiven Patienten  
unter einer hochaktiven antiretroviralen Therapie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christian Körner

aus

Magdeburg

Bonn, 2011



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Spengler
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Herzog

Tag der Promotion: 24.11.2011  
Erscheinungsjahr: 2011



# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) .....	1
1.1.1 Taxonomie .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	2
1.1.3 Übertragung .....	2
1.1.4 Klinischer Verlauf.....	3
1.1.5 Aufbau .....	4
1.1.6 Replikationszyklus.....	5
1.1.7 Therapie der HIV-Infektion .....	6
1.2 Das Hepatitis C-Virus (HCV).....	8
1.2.1 Taxonomie .....	8
1.2.2 Epidemiologie .....	9
1.2.3 Übertragung .....	9
1.2.4 Klinischer Verlauf.....	10
1.2.5 Aufbau .....	10
1.2.6 Replikationszyklus.....	11
1.2.7 Therapie der HCV-Infektion.....	12
1.3 HIV/HCV-Koinfektion.....	12
1.3.1 Epidemiologie .....	12
1.3.2 Klinischer Verlauf.....	13
1.4 Mechanismen der HIV-vermittelten CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Depletion.....	14
1.4.1 T-Zell-Neubildung im Thymus.....	14
1.4.2 CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Neubildung bei der HIV-Infektion.....	15
1.4.3 Apoptose – Initiation und Ablauf .....	15
1.4.4 CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei der HIV-Infektion .....	17
1.5 Ziele der Arbeit.....	18
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>20</b>
2.1 Geräte.....	20

2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	20
2.3	Antikörper .....	21
2.4	Puffer und Medien .....	21
2.5	Kits .....	21
2.6	Patienten .....	22
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>25</b>
3.1	Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation.....	25
3.1.1	Prinzip .....	25
3.1.2	Durchführung.....	25
3.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	26
3.3	Immunmagnetische Isolation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	26
3.4	DNA-Extraktion.....	27
3.5	Echtzeit-PCR .....	27
3.5.1	Prinzip .....	27
3.5.2	Nachweis des CCR5-Gens von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	27
3.5.3	Nachweis von TRECs aus CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	28
3.5.4	Berechnung von RTE (engl. recent thymic emigrants).....	30
3.6	Kurzzeit-Kultivierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC).....	30
3.7	<i>In vitro</i> Induktion der Apoptose in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	31
3.7.1	Prinzip .....	31
3.7.2	Durchführung.....	31
3.8	Durchflusszytometrie .....	32
3.9	Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	33
3.9.1	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) .....	33
3.9.2	Detektion des Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) p85-Fragments .....	34
3.9.3	Detektion aktivierter Caspase-3 .....	35
3.10	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von Todesrezeptoren und ihrer Liganden.....	36
3.11	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	36

3.11.1	Prinzip.....	36
3.11.2	Durchführung .....	37
3.12	Statistische Methoden .....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
4.1	CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Neubildungsrate .....	39
4.2	Untersuchungen zum Einfluss der HCV-Koinfektion auf die CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose.....	43
4.2.1	<i>Ex vivo</i> CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA .....	43
4.2.2	<i>Ex vivo</i> CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV-RNA(-) Patienten.....	46
4.3	Expression und Funktion von Todesrezeptoren und ihren Liganden.....	52
4.3.1	Fas-Ligand und Fas-Rezeptor.....	52
4.3.1.1	Oberflächenexpression des Fas-Rezeptors auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	52
4.3.1.2	Serumspiegel und Oberflächenexpression des Fas-Liganden auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen....	54
4.3.1.3	<i>In vitro</i> Induktion von Fas-vermittelter Apoptose .....	56
4.3.1.4	Fas-Oberflächenexpression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-RNA(-) Patienten.....	58
4.3.1.5	Expression und Sekretion des FasL bei HIV-RNA(-) Patienten .....	60
4.3.1.6	<i>In vitro</i> Induktion von Fas-vermittelter Apoptose bei HIV-RNA(-) Patienten .....	61
4.3.2	TRAIL und TRAIL-Rezeptoren 1 (DR4) und 2 (DR5).....	63
4.3.2.1	Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen....	63
4.3.2.2	Serumspiegel und Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	64
4.3.2.3	Expression und Sekretion von TRAIL bei HIV-RNA(-) Patienten.....	65
4.3.2.4	<i>In vitro</i> Induktion von TRAIL-Rezeptor-vermittelter Apoptose.....	67
4.3.3	TNF- $\alpha$ und TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1.....	68
4.3.3.1	Oberflächenexpression des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	68
4.3.3.2	Serumspiegel und Oberflächenexpression von TNF- $\alpha$ auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	69
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
5.1	Untersuchungen zur CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Neubildungsrate bei HIV/HCV-Koinfektion .....	70
5.2	Untersuchungen zur CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion.....	74
5.2.1	CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA .....	74
5.2.2	Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion .....	75
5.2.3	Einfluss der cART auf die CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion .....	80
5.3	Zusammenfassende Beurteilung des Einflusses der HCV-Koinfektion auf die HIV-Progression..	
	.....	84

<b>6</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>85</b>
6.1	Literaturverzeichnis.....	85
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	94
6.3	Tabellenverzeichnis.....	95
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	96
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>98</b>



### ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung des HI-Virus (HIV) Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelte sich die HIV-Infektion zu einer globalen Epidemie mit mittlerweile über 30 Millionen Infizierten. Aufgrund gemeinsamer Transmissionswege ist eine wachsende Zahl dieser Patienten zusätzlich mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) infiziert. Nach letzten Schätzungen sind weltweit bis zu 7 Millionen Menschen mit HIV und HCV koinfiziert.

Die HIV/HCV-Koinfektion stellt damit ein zunehmendes epidemiologisches und medizinisches Problem dar. HCV-assoziierte Erkrankungen zählen mittlerweile zu den häufigsten Todesursachen bei HIV-infizierten Patienten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die HIV/HCV-Koinfektion mit einem beschleunigten Verlauf der Hepatitis C assoziiert ist. Inwieweit dagegen eine Koinfektion mit HCV Einfluss auf die Progression der HIV-Infektion nimmt, ist bislang immer noch unklar und die bisher veröffentlichten Studien zeichnen ein komplexes und uneinheitliches Bild.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen einer HCV-Koinfektion auf HIV-assoziierte Mechanismen der Depletion von T-Helferzellen näher zu untersuchen und die Ergebnisse in Zusammenhang mit den bislang publizierten Studien zum klinischen Verlauf der HIV/HCV-Koinfektion zu setzen. In dieser Arbeit wurden daher der Zelltod und die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion näher beleuchtet. Beide Mechanismen sind zentrale Säulen der T-Zell-Homöostase. Diese ist durch die chronische HIV-Infektion gestört und wird möglicherweise auch durch eine HCV-Koinfektion beeinträchtigt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion bestimmt. Die Produktion immunokompetenter T-Helferzellen erfolgt durch die Differenzierung von Vorläufern der T-Zellen im Thymus. Vorangegangene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die HIV-Replikation auch im Thymus stattfindet und eine HIV-Infektion mit einem verringerten Anteil der kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten T-Helferzellen (*engl. recent thymic emigrants, RTE*) assoziiert war.

In dieser Arbeit wurde die Anzahl von RTE durch die Quantifizierung von sogenannten TRECs (*engl. T cell receptor excision circles*) ermittelt. TRECs sind stabile extrachromosomale, bei der Mitose nicht-replizierte DNA-Schnittprodukte, die im Zuge der Gen-Neuordnung bei der Bildung des T-Zell-Rezeptors im Thymus entstehen. Die Quantifizierung von TRECs wurde durch Douek *et al.* im Jahr 1998 als Methode zur Bestimmung der Thymusfunktion etabliert.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion verringerte TREC-Konzentrationen in ihren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen. Diese Befunde deuten auf eine verminderte *de novo* Produktion von T-Helferzellen durch

den Thymus bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten hin. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur offenbarte jedoch zum einen Probleme in der Vergleichbarkeit der Resultate. So wurden neben der T-Helferzell-Zahl auch PBMC als Bezugssystem für die TREC-Konzentration verwendet. Zum anderen kamen die einzelnen Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich eines möglichen Einflusses der HCV-Infektion auf die *de novo* Produktion von T-Helferzellen. Ein weiteres biologisches Problem, welches die Aussagekraft von TREC-Werten einschränkt, ist die vermehrte Zellteilung im Zuge der HIV- und HCV-assoziierten Immunaktivierung. Auch diese ist in der Lage die TREC-Konzentrationen zu beeinflussen.

Vor diesem Hintergrund war die Frage, inwieweit eine verminderte Produktion des Thymus Anteil an dem schlechteren immunologischen Verlauf der HIV-Infektion bei Patienten mit einer HCV-Koinfektion hat, nach unseren Ergebnissen und der vorhandenen Literatur schwer zu beantworten, letztendlich jedoch eher zu verneinen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse des Zelltods von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion. Hierzu wurde der Anteil apoptotischer T-Helferzellen in verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen bestimmt. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass Apoptose einen wichtigen Mechanismus bei der fortschreitenden Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-Infizierten darstellt.

Frühere Befunde, die eine signifikante Assoziation der HIV-Infektion mit einer erhöhten Apoptoserate der T-Helferzellen beobachteten, konnten durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Patienten mit einer HCV-Monoinfektion eine HCV-Koinfektion einen pro-apoptotischen Effekt bei unbehandelten HIV-positiven Patienten hat. Während eine HCV-Monoinfektion verglichen mit gesunden Probanden keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate von T-Helferzellen hatte, war der Anteil apoptotischer Zellen bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion signifikant erhöht, sowohl im Vergleich zu gesunden Probanden als auch im Vergleich zu HIV- und HCV-monoinfizierten Patienten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die T-Helferzell-Apoptoserate beider HIV-positiver Patientengruppen mit der HIV-Last korrelierte.

Bei Patienten, die durch eine effektive antiretrovirale Kombinationstherapie eine maximale Suppression der HIV-Replikation aufwiesen, konnte demnach kein direkter Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Der Anteil apoptotischer T-Helferzellen von therapierten HIV/HCV-koinfizierten Patienten unterschied sich nicht gegenüber der HIV-monoinfizierten Patientengruppe. Eine residuale Apoptose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnte jedoch in beiden Patientengruppen nachgewiesen werden. Die Stratifizierung der Patienten nach der Zusammensetzung ihrer antiretroviralen Therapie lieferte einen Hinweis auf einen möglichen pro-apoptotischen Effekt von Protease-Inhibitoren.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Im letzten Teil der Arbeit konnte ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus zur Klärung der hohen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten identifiziert werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die bereits bei der HIV- und HCV-Monoinfektion beschriebenen Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Apoptose bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion einen synergistischen Mechanismus darstellen, der in Übereinstimmung mit den ermittelten Apoptoseraten der einzelnen Patientengruppen stand.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des Apoptose-vermittelnden Rezeptors Fas auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer HIV/HCV-Koinfektion assoziiert war, nicht nur im Vergleich mit gesunden Probanden, sondern auch im Vergleich mit einer HIV-Monoinfektion. Übereinstimmend damit waren T-Helferzellen von HIV/HCV-koinfizierten Patienten am empfindlichsten gegenüber FasL-induzierter Apoptose *in vitro*. Die in HIV- und HIV/HCV-koinfizierten Patienten beobachtete verstärkte Expression und Sekretion des korrespondierenden Liganden FasL war dagegen hauptsächlich HIV-induziert. Im Gegensatz zur signifikanten Reduktion der Apoptoserate von T-Helferzellen im Vergleich zu virämischen HIV-positiven Patienten konnte bei Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-Last bezüglich der Fas-Expression nur eine geringe Abnahme beobachtet werden. Eine effektive antiretrovirale Therapie war dagegen mit einer Normalisierung des Fas-Liganden assoziiert, sowohl bei HIV-monoinfizierten als auch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten.

Die ermittelten Resultate weisen auf eine synergistische Interaktion von HIV und HCV auf die Fas/FasL-vermittelte Induktion von Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen hin und unterstreichen zudem die bedeutende Rolle des Fas-Systems in der Pathogenese der HIV- und HCV-Infektion und im Besonderen in der HIV/HCV-Koinfektion. Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse die Theorie, dass eine HCV-Koinfektion mit einem beschleunigten Verlauf der HIV-Infektion bei unbehandelten Patienten assoziiert sein könnte. Der von Carlos *et al.* beobachtete verstärkte Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten wäre demnach durch die hohe Apoptoserate erklärbar.

Dagegen lieferten die erbrachten Ergebnisse keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Immunrekonstitution im Rahmen einer effektiven antiretroviralen Therapie. Damit stützen sie die Beobachtungen neuerer Studien, die im Gegensatz zu älteren Studien keinen Unterschied mehr im Anstieg der T-Helferzell-Zahl zwischen HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten fanden.



## 1 EINLEITUNG

Die HIV-Infektion und die Hepatitis C sind global verbreitete Infektionskrankheiten. Sie stellen die betroffenen Patienten, behandelnden Ärzte sowie die Gesellschaften vor große medizinische und soziale Probleme. Aufgrund von gemeinsamen Transmissionswegen ist eine wachsende Anzahl von Menschen sowohl mit dem HI-Virus als auch mit dem Hepatitis C-Virus infiziert (HIV/HCV-Koinfektion).

Die HIV/HCV-Koinfektion hat gravierende Auswirkungen auf den klinischen Verlauf und das Management der beiden Infektionen und stellt daher ein zunehmendes medizinisches und epidemiologisches Problem dar<sup>1</sup>.

Die wachsende Bedeutung der Koinfektion zeigt sich darin, dass Hepatitis C-Virus (HCV)-assoziierte Erkrankungen mittlerweile zu den häufigsten Todesursachen bei HIV-infizierten Patienten zählen und die Koinfektion mit HCV mit einer gesteigerten Gesamtmortalität in dieser Patientengruppe verbunden ist<sup>2,3</sup>.

### 1.1 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV)

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist 1983 als der auslösende Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (*engl.* Acquired Immune Deficiency Syndrome) identifiziert worden<sup>4</sup>. Die Infektion führt zu einer sich im Laufe der Zeit entwickelnden Immunschwäche. Das Endstadium wird als AIDS bezeichnet. AIDS zeichnet sich durch schwere opportunistische Infektionen aus und wurde erstmals 1981 bei einer Gruppe junger homosexueller Männer beschrieben<sup>5</sup>.

#### 1.1.1 Taxonomie

Die taxonomische Klassifizierung von Viren erfolgt über die Genomorganisation und der Art der Replikation. Aufgrund dieser Merkmale wird das HI-Virus in die Familie der Retroviridae eingeordnet. Diese umfasst sieben verschiedene Gattungen, zu denen auch der Genus der Lentiviren zählt, in dem das HI-Virus einzuordnen ist.

Zwei Subtypen des HI-Virus, als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet, sind bislang identifiziert worden<sup>6</sup>. Aufgrund von Sequenzunterschieden wird HIV-1 in weitere Untergruppen unterteilt. Hierzu gehören die Hauptgruppe M (*major group*) mit neun Subtypen, sowie die Gruppen O und N<sup>7,8</sup>.

Die Ursprünge des HI-Virus gehen mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Übertragung von Viren aus der Gruppe der simianen Immundefizienz-Viren (SIV) von bestimmten Primaten (Altweltaffen und Menschenaffen) auf den Menschen zurück (Zoonose)<sup>9</sup>. Die phylogenetischen Wurzeln des Subtyps

HIV-1 sind höchstwahrscheinlich bei Schimpansen (*Pan troglodytes*) zu finden, deren SIV<sub>cpz</sub> starke Ähnlichkeit mit HIV-1 aufweist<sup>10</sup>. HIV-2 ähnelt dagegen SIV<sub>sm</sub> aus westafrikanischen schwarzen Mangaben (*Cercocebus atys*) und wurde vermutlich mehrfach separat auf den Menschen übertragen. SIV löst bei Schimpansen und Rhesus-Makaken eine AIDS-ähnliche Erkrankung aus<sup>11,12</sup>.

### 1.1.2 Epidemiologie

Nach den letzten Erhebungen von UNAIDS waren im Jahr 2009 weltweit ca. 33,3 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert<sup>13</sup>. Davon waren 2,6 Millionen Fälle auf Neuinfektionen zurückzuführen. Die Zahl der AIDS-assoziierten Todesfälle lag im Jahr 2009 bei 1,8 Millionen. Der größte Teil der weltweiten Erkrankungen und Todesfälle ist auf eine Infektion mit HIV-1 (> 99 %) zurückzuführen. Die Infektion mit HIV-2 zeichnet sich dagegen durch eine reduzierte Pathogenität aus und beschränkt sich vor allem auf Westafrika und die ehemaligen portugiesischen Kolonien (Brasilien, Angola, Guinea-Bissau)<sup>14,15</sup>. Mittlerweile breitet sich HIV-2 auch im Südwesten Indiens aus<sup>16</sup>.

In Deutschland lebten zum Ende des Jahres 2010 ca. 70.000 Menschen mit HIV/AIDS<sup>17</sup>. Während die Zahl der HIV-Neuinfektionen im Jahr 2010 bei ca. 3000 lag, wurden etwa 550 Todesfälle von HIV-Infizierten registriert.

### 1.1.3 Übertragung

Das HI-Virus wird hauptsächlich durch ungeschützte Sexualkontakte übertragen. In 80 % der Fälle erfolgt die Infektion durch homo- oder heterosexuelle Transmission<sup>18</sup>. Des Weiteren ist auch eine Infektion durch kontaminiertes Blut, sowie durch die vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind möglich. Die höchsten Viruskonzentrationen sind im Blut und in der Samenflüssigkeit von HIV-Infizierten zu finden<sup>19</sup>.

Bezüglich der sexuellen Transmission von HIV hängt die Effizienz der Übertragung im Wesentlichen von der Viruskonzentration in Samen- und/oder Vaginalflüssigkeit ab. Beeinträchtigungen der mukosalen Barriere des Genitaltraktes durch Verletzungen, Entzündungen und Geschlechtskrankheiten steigern das Risiko einer HIV-Infektion<sup>20</sup>. Je nach Art der Sexualpraktik liegt das Transmissionsrisiko zwischen 0,03 % und 5,6 % je Kontakt<sup>21</sup>.

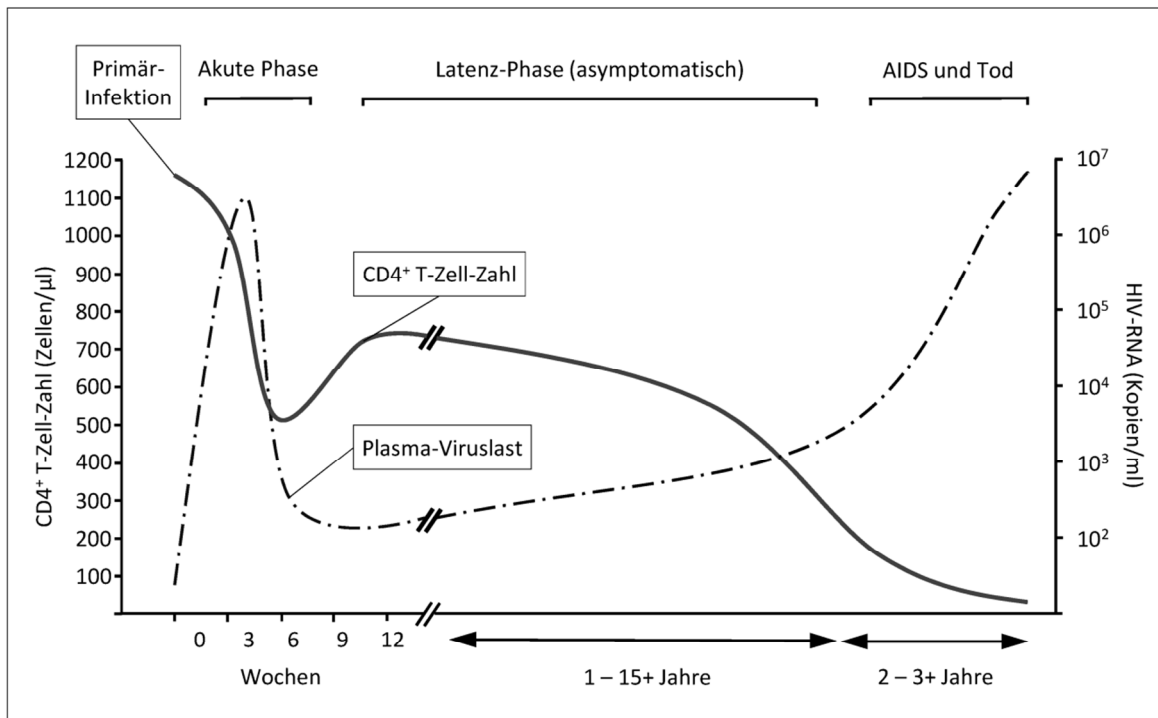
Die Hauptrisikogruppe für die HIV-Übertragung über das Blut sind Konsumenten von intravenös applizierten Drogen (*engl. intravenous drug users, IVDU*). Die Infektion erfolgt hierbei im Wesentlichen über die gemeinsame Nutzung von Spritzenutensilien. Das Infektionsrisiko durch infizierte Blutkonserven und Blutprodukte ist in Deutschland seit der Einführung eines HIV-Antikörpertests im Jahr 1985 und weiterer diagnostischer Tests vernachlässigbar.

Das Risiko einer vertikalen Übertragung von HIV durch die Mutter auf das Kind kann bis zu 40 % betragen. Die Transmissionsrate kann jedoch durch verschiedene Maßnahmen wie eine prophylaktische antiretrovirale Therapie, Kaiserschnittgeburt oder Stillverzicht, stark gesenkt werden<sup>20</sup>.

**1.1.4 Klinischer Verlauf**

Infolge einer Übertragung kommt es zur Infektion der Zielzellen des HI-Virus. Hierzu zählen Zellen des Immunsystems, die auf der Zelloberfläche den Rezeptor CD4 exprimieren<sup>22,23</sup>. Insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden infiziert. Diese sogenannten T-Helferzellen besitzen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung und Verstärkung der adaptiven Immunantwort.

Die akute Phase der HIV-Infektion ist mit einer hohen Virusreplikation und einer unkontrollierten Neuinfektion von T-Helferzellen assoziiert (Abbildung 1.1). Als Folge kommt es zum vermehrten Tod von T-Helferzellen vornehmlich im Lymphgewebe und im lymphatischen Gewebe des Magen-Darm-Trakts<sup>24</sup>. Diagnostisch lässt sich dies an einem starken Abfall der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl im Blut und an einem Anstieg des Virustiters auf bis zu 10<sup>8</sup> Partikel/ml Blut feststellen. Die akute HIV-Infektion führt in 40 - 90 % der Fälle zu temporären Symptomen. Hierzu zählen vor allem Fieber und ein makulopapulärer Hautausschlag<sup>25</sup>.



**Abb. 1.1: Klinischer Verlauf der HIV-Infektion** (verändert nach <sup>26</sup>).

Der Primärinfektion schließt sich eine symptomfreie Latenzphase an, die zwischen 8 – 10 Jahre andauert<sup>27,28</sup>. Diese wird zu Beginn durch ein Absinken der Viruskonzentration infolge der adaptiven Immunantwort und einem partiellen Anstieg der T-Helferzahl im peripheren Blut charakterisiert. Während sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl nicht mehr vollständig erholt, verbleibt der Virustiter auf einem unterschiedlich niedrigerem Niveau, der als viraler Set Point bezeichnet wird und als starker Prädiktor für die spätere Progression der HIV-Infektion dient<sup>29</sup>. In der Folge führt die anhaltende Virusreplikation zu einem stetigen Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einem Absinken der T-Helferzahl. Unterhalb von 200 Zellen/ $\mu$ l kommt es zunehmend zum Auftreten von opportunistischen und anderen AIDS-definierenden Erkrankungen, wie z.B. *Herpes zoster*-Infektionen, Candidosen, Pneumocytis-Pneumonie und das Karposi-Sarkom. Diese führen bei stark immungeschwächten Patienten letztlich zum Tod.

### 1.1.5 Aufbau

HIV-1 und HIV-2 sind im elektronenmikroskopischen Bild kaum zu differenzieren, weisen in ihrer RNA-Sequenz jedoch nur 40 – 60 % Homologie auf<sup>30</sup>. Aufgrund der weltweiten Verbreitung von HIV-1 wird im Weiteren nur dieser Subtyp beschrieben.

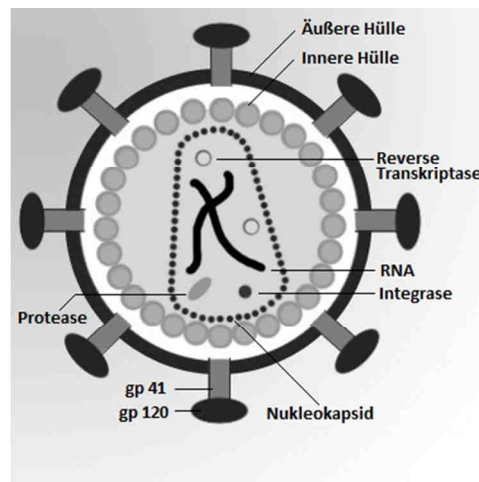
Das HI-Virus hat einen Durchmesser von ca. 100 nm und wird von einer Lipoproteinhülle umgeben. In die Hüllmembran sind virale Glykoproteinkomplexe (gp160) integriert (Abbildung 1.2). Sie bestehen aus dem Transmembranprotein gp41 und dem Hüllprotein gp120, welches nicht-kovalent an gp41 gebunden ist. Zudem enthält die aus der Wirtszellmembran hervorgegangene Virushülle verschiedene wirtseigene Proteine, wie z.B. HLA-Klasse-I und -II Moleküle sowie Adhäsionsproteine.

Die Innenseite der Virushülle wird vom Matrixprotein p17 ausgekleidet. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Nukleokapsid, welches sich aus einem konischen Kapsid und einem darin enthaltenen Protein-Nukleinsäurekomplex zusammensetzt. Das Kapsid besteht aus dem Kapsidprotein p24 und ist über das Link-Protein p6 mit der Hüllmembran verbunden. Der Protein-Nukleinsäurekomplex besteht aus zwei viralen RNA-Genomen, die am Nukleokapsidprotein p7 sowie der reversen Transkriptase (p66) gebunden sind. Außerdem befinden sich noch weitere, für die Virusreplikation essentielle Proteine im Kapsid, z.B. die Integrase (p32) und die Protease (p11).

Das Genom von HIV-1 besteht aus einer einzelsträngigen RNA und hat eine Größe von ca. 9,6 kbp. Der Aufbau des Genoms folgt mit 5'LTRgag- pol-env-LTR3' dem klassischen Schema retroviraler Viren. Die als LTR (*engl. long terminal repeat*) bezeichneten Regionen am Anfang und Ende des Genoms sind für die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom essentiell. *Gag* (Gruppenantigen) kodiert für das Matrixprotein p17 sowie für Bestandteile des Nukleokapsids



(p24 und p7). In der *Pol*-Region (Polymerase) liegt die genetische Information für die nicht-strukturellen Proteine, Protease, reverse Transkriptase und Integrase. Die Gene der *env*-Region (*envl. envelope*) kodieren dagegen für die Glykoproteine gp41 und gp120 der Virushülle. Des Weiteren sind im HIV-Genom noch sechs weitere Proteine codiert, die akzessorische (*nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*) bzw. regulatorische (*tat* und *rev*) Aufgaben erfüllen.



**Abb. 1.2: Schematischer Aufbau des HI-Virus** (Illustration: M. Gusovius, verändert nach <sup>31</sup>)

### 1.1.6 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des HI-Virus beginnt mit der Infektion der entsprechenden Wirtszelle. Bereits ein Jahr nach der Entdeckung des HI-Virus wurde 1984 das CD4-Molekül als essentieller Rezeptor für HIV identifiziert<sup>22,23</sup>. CD4 ist als Korezeptor Bestandteil des T-Zellrezeptors, welcher MHC-Klasse II Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) erkennt. Neben T-Lymphozyten exprimieren auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen CD4 auf ihrer Oberfläche.

Die Adsorption des Virus an der Oberfläche der Wirtszelle erfolgt durch die Bindung von gp120 an das CD4-Molekül. Für die Verschmelzung des Viruspartikels mit der Wirtszellmembran benötigt HIV einen viralen Korezeptor. Die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 wurden 1996 als essentielle Korezeptoren für die Fusion des Virus mit der Wirtszelle identifiziert<sup>32,33,34,35</sup>. Eine Konformationsänderung im Zuge der CD4-Bindung ermöglicht es dem gp120-Molekül, eine Interaktion mit dem entsprechenden Korezeptor einzugehen. Diese löst eine Konformationsänderung des transmembranen gp41-Moleküls aus und führt schließlich zur Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran.

HIV-1 Isolate lassen sich grundsätzlich in monozytotrope und T-lymphotrope Isolate einteilen. Monozytotrope Isolate verwenden CCR5 als Korezeptor und infizieren vorwiegend Monozyten und

Makrophagen, T-lymphotrope Isolate infizieren vorwiegend aktivierte CD4-positive Zellen über CXCR4<sup>36</sup>.

Nach der Fusion gelangt das intakte virale Kapsid ins Zellinnere und wandert in Richtung des Zellkerns. Innerhalb des Kapsids wird dann bereits das RNA-Genom des HI-Virus durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Mit Erreichen der Kernporen ist die Transkription beendet und es folgt die Freisetzung des Kapsid-Inhalts („uncoating“)<sup>37</sup>.

Für die erfolgreiche Replikation des HI-Virus ist die Integration der proviralen DNA in das Wirtszellgenom unabdingbar. Die virale Integrase vermittelt die Translokation des sogenannten Präintegrationskomplexes in den Zellkern und die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom. Das nun integrierte Provirus kann über Monate oder Jahre im Genom der Wirtszelle verbleiben. Mit der Aktivierung der Zielzelle kommt es zur Transkription der Provirus-DNA. Die Synthese der frühen regulatorischen Proteine *tat* und *rev*, welche die Aktivität der Expression beeinflussen, führt zu einer verstärkten Transkription von viralen mRNAs sowie des Virusgenoms. Die Translation der mRNAs führt zur Synthese der Strukturproteine und viralen Enzyme, die vorerst als Polyproteine vorliegen. Die gebildeten viralen Bestandteile lagern sich nun an der Plasmamembran zusammen. Im Zuge der Spaltung der Präkursorproteine durch die virale Protease kommt es zur Knospung unreifer Viruspartikel („budding“). Dieser Vorgang löst in der Wirtszelle den programmierten Zelltod aus. Die freigesetzten Viruspartikel reifen durch die weitere Prozessierung der Vorläuferproteine durch die virale Protease und sind anschließend als infektiöse Virionen wieder in der Lage erneut Zellen zu infizieren.

### 1.1.7 Therapie der HIV-Infektion

Ziel der Behandlung der HIV-Infektion ist die effektive Suppression der HIV-Replikation und eine damit einhergehende Erholung der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen im Blut (Immunrekonstitution). Im Weiteren wird eine vollständige Eradikation möglicher Reservoirs des HI-Virus verfolgt. Als potentielle Zielstrukturen einer medikamentösen Therapie bieten sich Virus-spezifische Proteine und Enzyme an, die für den Replikationszyklus essentiell sind.

1987 wurde erstmals ein Medikament zur Behandlung der HIV-Infektion zugelassen. Ziduvodin (Azidothymidin, AZT) gehört in die Wirkstoffklasse der Nukleos(t)idischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und besitzt als Zielstruktur die Reverse Transkriptase des HI-Virus. Im Verlauf der letzten 25 Jahre wurden weitere Medikamente gegen diverse virale Zielstrukturen entwickelt und zugelassen. Diese werden in der Regel als Kombinationstherapien eingesetzt, um einer Resistenzbildung gegen einzelne Substanzen vorzubeugen. Die zum heutigen Zeitpunkt verfügbaren Wirkstoffe ermöglichen eine dauerhafte Inhibierung der viralen Replikation unter die derzeit gültige

Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml Blut. Damit verbunden ist eine substantielle Steigerung der Lebenserwartung. Eine umfassende Eradikation des Virus ist nach dem derzeitigen Stand jedoch erst nach 60 – 70 Jahren zu erwarten<sup>38</sup>. Ein Absetzen der antiretroviralen Therapie führt daher zu einer erneuten Vermehrung des HI-Virus und einem messbaren Anstieg des Virustiters.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Wirkstoffklassen, deren Wirkmechanismus und bedeutende Nebenwirkungen kurz vorgestellt. Die derzeit 28 zugelassenen Einzel- oder Kombinationspräparate für die Behandlung der HIV-Infektion verteilen sich auf fünf verschiedene Wirkstoffklassen:

1. Nukleosidische bzw. Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
3. Protease-Inhibitoren (PIs)
4. Entry-Inhibitoren (Korezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren)
5. Integrase-Inhibitoren

**Nukleosidische bzw. Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)** waren die ersten Substanzen, die für die Therapie der HIV-Infektion zugelassen worden waren. Als Nukleosidanaloga konkurrieren sie mit den physiologischen Nukleosiden als alternative Substrate für die Reverse Transkriptase. Charakteristisch für sie ist das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe im Ribosemolekül, welches zur Bildung von Phosphodiesterbrücken benötigt wird und für die Kettenverlängerung essentiell ist. Der Einbau der Nukleosidanaloga führt daher zum Abbruch des wachsenden DNA-Strangs bei der Transkription des viralen RNA-Genoms. Nukleosidanaloga werden von der Zelle unverändert aufgenommen und erst durch eine schrittweise Phosphorylierung in ihre wirksame Form überführt („Pro-Drugs“). Bekannte und häufig verwendete Wirkstoffe sind Lamivudin, Zidovudin, Tenofovir und Abacavir. Zu den wichtigsten Nebenwirkungen der NRTIs gehören Myelotoxizität, Laktatazidose und Polyneuropathie. Diese Schädigungen werden ursächlich durch mitochondriale Toxizität hervorgerufen<sup>39</sup>.

**Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)** wurden erstmals 1990 beschrieben und werden heute meist in Kombination mit NRTIs eingesetzt. NNRTIs besitzen wie Nukleosidanaloga die gleiche Zielstruktur, binden jedoch direkt an die Reverse Transkriptase. Dadurch wird die katalytisch aktive Bindungsstelle des Enzyms blockiert und die Polymerisation des DNA-Strangs verlangsamt. Im Gegensatz zu NRTIs liegen NNRTIs beim Eintritt in die Zelle bereits in wirksamer Form vor. Zu den NNRTIs zählen Delavirdin, Efavirenz, Etravirin und Nevirapin.

**Protease-Inhibitoren (PIs)** wurden Mitte der 90er Jahre entwickelt und hemmen selektiv die HIV-Protease. Die Blockierung der katalytischen Aktivität des Enzyms verhindert die proteolytische

Aufspaltung des gag-pol-Polyproteins und führt zu unreifen, nicht infektiösen Viruspartikeln. Die Entwicklung von PIs erlaubte seit 1996 den Einsatz von Wirkstoffen verschiedener Substanzklassen in einer Kombinationstherapie (*engl. combined antiretroviral therapy, cART*), die als „Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)“ bezeichnet wurde. Bekannte Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Indinavir, Saquinavir, Darunavir, Atazanavir und Ritonavir. Letzterer wird häufig als Verstärker (*engl. Booster*) in Kombination mit einem anderen PI eingesetzt, da Ritonavir ein sehr potenter Inhibitor des Cytochrom P450-Enzymsystems ist. Durch die Hemmung können die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter, z.B. Maximalkonzentration und Halbwertszeit fast aller PIs deutlich gesteigert („geboostert“) werden<sup>40</sup>. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören neben gastrointestinalen Beschwerden Lipodystrophie und Dyslipidämie.

**Entry-Inhibitoren** umfassen eine Gruppe von Wirkstoffen, die durch unterschiedliche Mechanismen die Fusion des Viruspartikels mit der Wirtszelle unterbinden. Während sich Substanzen zur Verhinderung der Bindung von CD4 und gp120 noch in der klinischen Erprobungsphase befinden, sind mit Maraviroc, einem CCR5-Antagonisten, und Enfuvirtide, einem Fusionsinhibitor, zwei Substanzen zugelassen worden, welche die nachfolgenden Schritte der Fusion inhibieren. Maraviroc blockiert die Interaktion von gp120 mit CCR5 durch eine allosterische Bindung an den Rezeptor. Enfuvirtide dagegen bindet an eine Intermediärstruktur des HIV-Proteins gp41, die bei der Fusion des HI-Virus mit der Zielzelle entsteht, wodurch die Fusion mit der Wirtszelle unvollständig bleibt.

**Integrase-Inhibitoren** haben als Zielstruktur die HIV-Integrase, welche den Transport in den Zellkern und den Einbau der viralen DNA in das Wirts-Genom vermittelt. Die beiden bislang zugelassenen Substanzen Raltegravir und Elvitegravir hemmen die Integrase bei der irreversiblen Verknüpfung von viraler und Wirts-DNA, sie werden auch als Strangtransfer-Inhibitoren (STIs) bezeichnet.

## 1.2 Das Hepatitis C-Virus (HCV)

Das Hepatitis C-Virus (HCV) wurde erstmals 1989 im Plasma eines Patienten mit einer NonA-nonB-Hepatitis identifiziert<sup>41</sup>. HCV infiziert hauptsächlich Hepatozyten und führt zu einer als Hepatitis C bezeichneten Entzündung der Leber. 90 % aller NonA-nonB-Hepatitis sind auf eine Infektion mit HCV zurückzuführen<sup>42</sup>.

### 1.2.1 Taxonomie

Aufgrund seines einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrangorientierung wird HCV in die Familie der Flaviviridae eingeordnet. Molekularbiologische Besonderheiten führten dazu, dass das Hepatitis C-Virus neben dem GBV-B-Virus in die eigenständige Gattung Hepacivirus eingeordnet wurde, welche

neben den beiden Genera Flavivirus und Pestivirus die Familie der Flaviviridae bilden<sup>43</sup>. Infolge der genetischen Variabilität des Hepatitis C Virus werden bislang 6 HCV-Genotypen mit mindestens 30 weiteren Subtypen unterschieden<sup>44,45</sup>.

### 1.2.2 Epidemiologie

Die weltweite Verbreitung des Hepatitis C Virus erfolgte innerhalb der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit ca. 180 Millionen Menschen mit HCV infiziert<sup>46</sup>. Dies entspricht ca. 3 % der Weltbevölkerung. Die HCV-Prävalenz ist dabei jedoch regional verschieden. In einigen Ländern des Mittleren Ostens sind bis zu 20 % der Bevölkerung mit HCV infiziert<sup>47</sup>. Generell ist der Anteil HCV-positiver Menschen in Afrika höher als in Nordamerika oder Europa. Die Seroprävalenz, d.h. der Anteil von Menschen mit HCV-Antikörpern im Blut im Vergleich zur Gesamtbevölkerung, beträgt in Deutschland ca. 0,4 %. Für das Jahr 2009 wurden ca. 5.400 Fälle von erstdiagnostizierter Hepatitis C an das Robert-Koch-Institut gemeldet.

Auch in der geographischen Verteilung der Genotypen und Subtypen gibt es deutliche Unterschiede: Die Genotypen 1 und 2 treten hauptsächlich in Nordamerika und Mitteleuropa auf, während im Mittleren Osten und Nordafrika der Genotyp 4 vorherrscht. Dagegen kommt der Genotyp 3 überwiegend in Südostasien, Indien und Pakistan vor. Während in Südafrika Patienten vorwiegend mit der HCV des Genotyps 5 infiziert sind, tritt der Genotyp 6 in Hongkong gehäuft auf. In Deutschland überwiegt der HCV-Genotyp 1<sup>48</sup>.

### 1.2.3 Übertragung

Der Hauptübertragungsweg von HCV ist der parenterale Blutkontakt. Hierzu zählt vor allem die Infektion durch Bluttransfusionen mit kontaminierten Blutkonserven und die gemeinsame Nutzung von kontaminiertem Spritzbesteck durch Drogenabhängige. In der Vergangenheit stellte die Transfusion von Blut und Blutprodukten einen großen Risikofaktor für die Übertragung von HCV dar<sup>49</sup>. Insbesondere bei Risikogruppen, wie z.B. Hämophilie-Patienten, lag die Infektionsrate bei über 90 %<sup>50</sup>. Seit der Einführung eines routinemäßigen Screenings der Blutkonserven Anfang der neunziger Jahre kommt diese Art der Transmission jedoch nur noch sehr selten vor. Vor diesem Hintergrund stellt die Mehrfachverwendung kontaminierter Spritzenutensilien bei den heutigen Neuinfektionen mit etwa 80 % den Hauptübertragungsweg dar.

Zu den weiteren seltenen Übertragungswegen zählen die Transplantation von Organen HCV-positiver Spender (in Deutschland durch das Transplantationsgesetz verboten<sup>51</sup>), ungeschützter

Sexualkontakt, perinatale Transmission von Schwangeren auf das ungeborene Kind sowie die repetitive Hämodialyse.

Als Beispiele für singuläre Ereignisse, die zur lokalen Verbreitung von HCV beigetragen haben, ist die Infektion von schwangeren Frauen im Rahmen einer Anti-D Immunprophylaxe in der DDR und in Irland Ende der siebziger Jahre zu erwähnen<sup>52,53</sup>.

#### 1.2.4 Klinischer Verlauf

Der Inokulation mit HCV folgt eine variable Inkubationszeit, die in der Mehrzahl der akuten Infektionen asymptomatisch verläuft. Nach etwa sechs bis zwölf Wochen tritt bei der Mehrheit der Patienten eine leicht verlaufende Leberentzündung auf, die sich diagnostisch durch erhöhte Aminotransferase-Werte nachweisen lässt. In weniger als 25 % der Fälle tritt ein Ikterus auf.

Ca. 80 % der akut HCV-Infizierten sind nicht in der Lage die Infektion innerhalb von sechs Monaten auszuheilen und entwickeln daraufhin eine chronische Hepatitis C. Diese ist mit einer fortschreitenden Fibrose der Leber assoziiert. Die Progression der HCV-Infektion verläuft in der Regel sehr langsam, so dass es erst über einen Zeitraum von 20-30 Jahren zu einer irreversiblen Schädigung des Lebergewebes kommt. Bei 20 - 30 % der chronisch Erkrankten führt die Infektion zu einer Leberzirrhose und bei ca. 1 - 5 % zu einem hepatozellulären Karzinom (HCC)<sup>54,55</sup>. Für letzteres gilt die chronische HCV-Infektion als eine der Hauptursachen und stellt die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar<sup>56</sup>.

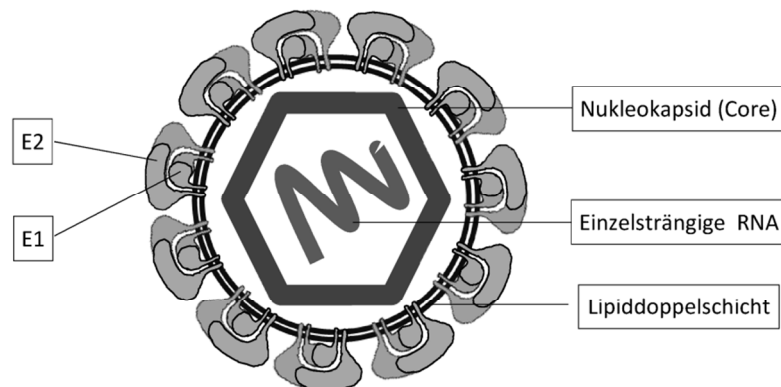
#### 1.2.5 Aufbau

Das Hepatitis C-Virus ist ein umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 50 - 55 nm<sup>57</sup>. In der Lipidmembran sind die viralen Oberflächenproteine E2 (gp70) und E1 (gp33) verankert, welche ein Heterodimer bilden (Abbildung 1.3). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich ein sphärisches Nukleokapsid, das aus dem viralen Protein Core gebildet wird und das virale Genom beinhaltet. Dieses besteht aus einzelsträngiger RNA in Positiv-Orientierung.

Die Größe des HCV-Genoms umfasst ca. 9,6 kb und beinhaltet einen offenen Leserahmen (*engl. open reading frame*, ORF), der für ein ca. 3.000 Aminosäuren (AS) langes Polyprotein kodiert. An den 5' und 3' Enden wird der ORF von nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert. Beide NTRs enthalten hoch konservierte Regionen, die für die Regulation der Virusreplikation essentiell sind.

Die Reihenfolge der einzelnen Proteine im Polyprotein vom N-Terminus gelesen umfasst die Strukturproteine Core, E1 und E2. Anschließend folgen die Nichtstrukturproteine p7, NS2/3/4 und NS5A/B. Durch zelluläre und virale Proteasen wird das virale Polyprotein in die einzelnen, funktionell aktiven Bestandteile gespalten. Die Strukturproteine und das p7-Protein werden durch eine zelluläre

Signalpeptidase prozessiert, die Spaltung der weiteren Nichtstrukturproteine erfolgt durch viruscodierte Proteasen. Die Nichtstrukturproteine besitzen unterschiedliche Funktionen: Das p7-Protein formt einen Ionen-Kanal und scheint eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von infektiösen Virionen zu spielen<sup>58</sup>. NS2 und NS3 bilden zusammen eine Protease, die an der Prozessierung des Polyproteins beteiligt ist. Der C-terminale Teil von NS3 besitzt dagegen eine ATPase/Helikase-Funktion. NS5B repräsentiert eine RNA-abhängige RNA-Polymerase.



**Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des Hepatitis C-Virus** (verändert nach <sup>59</sup>).

### 1.2.6 Replikationszyklus

Die Reproduktion des Hepatitis C-Virus findet in erster Linie in Hepatozyten statt. Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine extra-hepatische Replikation bestimmter HCV-Isolate in Geweben und Zelltypen, vor allem in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC*)<sup>60,61</sup>. Die Relevanz dieser Befunde wird jedoch kontrovers diskutiert<sup>62</sup>.

Der erste Schritt des viralen Eintritts ist die Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Die zellulären Rezeptoren, die für die Adsorption des Virus an die Zelloberfläche benötigt werden sind noch nicht eindeutig identifiziert. Jedoch konnten durch *in vitro* Versuche mehrere potentielle HCV-Rezeptoren nachgewiesen werden. Hierzu zählen das Tetraspanin CD81<sup>63</sup>, sowie als weitere essentielle Kofaktoren der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1<sup>64</sup>, LDL-Rezeptor<sup>65</sup> und die Tight Junction-Proteine Claudin-1<sup>66</sup> und Occludin<sup>67</sup>. Nach der Adsorption wird das Virus endozytotisch über Clathrin-Vesikel von der Wirtszelle aufgenommen<sup>68</sup>. Durch Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran gelangt das virale Capsid in das Zytoplasma<sup>69</sup>. Nach dem „Uncoating“ erfolgt ohne weitere Transkription die Translation des viralen Genoms.

Das entstehende Polyprotein wird durch zelluläre und virale Enzyme in die aktiven Virusproteine gespalten. Als Folge kommt es zur Ausbildung des HCV-Replikationskomplexes, der auch Membranen des ER beinhaltet. Aufgrund seiner elektronenoptischen Morphologie wird der Replikationskomplex

auch als „*membranous web*“ bezeichnet<sup>70,71</sup>. Die Bildung neuer Virusgenome wird durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert. Im Anschluss an die Synthese aller viralen Proteine und der Replikation des Genoms erfolgt die Zusammensetzung des Virus an sog. *Lipid droplets* im Endoplasmatischen Retikulum (ER)<sup>72</sup>. Es kommt daraufhin zur Abknospung der einzelnen Viruspartikel in das Lumen des ER<sup>73</sup>. Im Zuge des vesikulären Transports zur Plasmamembran kommt es zur Glykosylierung der Membranproteine im Golgi-Apparat. Durch die Fusion der Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran werden die infektiösen Viruspartikel freigesetzt.

### 1.2.7 Therapie der HCV-Infektion

Die Behandlung der akuten wie auch der chronischen Hepatitis C erfolgt derzeit in Form einer Kombinationstherapie aus Ribavirin und pegyliertem Interferon- $\alpha$ . Der Therapieerfolg ist dabei abhängig vom HCV-Genotyp des Patienten. Während bei mehr als 80 % der Patienten, die mit dem HCV-Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, ein dauerhaftes Therapieansprechen zu beobachten ist, sind es bei Patienten, die mit HCV-Genotyp 1 oder 4 infiziert sind, nur etwa 50 %<sup>74,75</sup>. Die spontane Ausheilung wie auch eine erfolgreiche Therapie führen zu keiner Immunisierung, so dass eine erneute Infektion mit HCV möglich ist. Neue Substanzen, die virale Enzyme direkt angreifen, sind derzeit in der Entwicklung<sup>76</sup>.

## 1.3 HIV/HCV-Koinfektion

### 1.3.1 Epidemiologie

Schätzungsweise 7 Millionen Menschen sind weltweit mit HIV und HCV koinfiziert. Das entspricht ca. 20 % alle HIV-positiven Patienten<sup>77</sup>. Die Seroprävalenz der HCV-Koinfektion ist jedoch regional verschieden sowie abhängig von den Risikofaktoren der Patienten.

Durch die effiziente Übertragung durch Blut-Blut-Kontakte ist der Anteil HCV-koinfizierter Individuen in bestimmten Risikogruppen sehr hoch. Hierzu zählen vor allem HIV-positive Hämophilie-Patienten und HIV-positive Abhängige intravenöser Drogen (IVDU). In diesen beiden Patientengruppen liegt die Prävalenz bei 70 – 90 %<sup>78,79</sup>. Vor diesem Hintergrund schwankt die Seroprävalenz der HCV-Koinfektion vor allem in Europa beträchtlich. In Deutschland beträgt der Anteil HCV-koinfizierter unter den HIV-Infizierten ca. 16 %, in Spanien und Italien jeweils ca. 50 %. In einigen Staaten der ehemaligen Sowjetunion wie z.B. Russland, Ukraine und Weißrussland sind sogar über 70 % der HIV-positiven Individuen mit HCV koinfiziert<sup>1</sup>.

Obwohl HCV hauptsächlich durch Blut übertragen wird, häufen sich in den letzten Jahren Berichte über die sexuelle Übertragung des Virus bei homosexuellen HIV-positiven Männern<sup>80,81,82</sup>. Diese



lokalen Epidemien wurden gehäuft in Metropolen der westlichen Welt beobachtet und sind wahrscheinlich auf verletzende Sexualpraktiken zurückzuführen<sup>83</sup>.

### 1.3.2 Klinischer Verlauf

Der Einfluss der HIV-Infektion auf den klinischen Verlauf der HCV-Infektion ist durch mehrere Studien sehr gut belegt worden<sup>84</sup>. Die Immunantwort gegenüber HCV scheint durch eine HIV-Infektion beeinträchtigt zu sein. Klinisch ist die HIV/HCV-Koinfektion daher mit einer beschleunigten Fibroseprogression und einem verkürzten Zeitraum bis zur Entwicklung einer Zirrhose assoziiert<sup>85</sup>. Die Häufigkeit eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) ist ebenfalls signifikant erhöht<sup>86</sup>. Im Vergleich zu HCV-Monoinfizierten tritt bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion ein Leberversagen signifikant häufiger auf<sup>78</sup>. Nach Karzinomen und AIDS-bedingten Todesfällen ist die Hepatitis C die dritthäufigste Todesursache bei HIV-Patienten<sup>2,3</sup>.

Eine effektive antiretrovirale Therapie führt zu einer verlangsamten Progression der HCV-assoziierten Lebererkrankungen und reduziert die Leber-bezogene Sterblichkeit bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten<sup>87,88</sup>.

Im Gegenzug konnte eine schnellere Progression der HIV-Infektion durch HCV nicht eindeutig bewiesen werden und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt immer noch kontrovers diskutiert. 2004 konnten Carlos Martin *et al.* in einer multivariaten Analyse zeigen, dass eine HCV-Koinfektion mit einem schlechteren immunologischen Verlauf assoziiert war<sup>89</sup>. Dieser Befund war unabhängig vom Alter, Geschlecht oder einer antiretroviralen Therapie.

Mögliche Effekte einer HCV-Koinfektion auf den Verlauf der Immunrekonstitution im Rahmen einer antiretroviralen Therapie wurden ebenfalls untersucht. Die Swiss Cohort Studie zeigte, dass die Koinfektion mit HCV mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines AIDS-definierenden Ereignisses und Tod assoziiert war<sup>90</sup>. Die Autoren vermuteten, dass diese Effekte der HCV-Koinfektion im Zusammenhang mit einem geringeren Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen stehen, der im Vergleich zur HIV-monoinfizierten Patientengruppe bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten beobachtet worden war. In einer späteren Studie an der gleichen Kohorte konnten diese Effekte allerdings nicht mehr beobachtet werden<sup>91</sup>. Eine weitere Studie konnte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bzgl. des Anstiegs der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl zwischen HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten nach Einleitung einer antiretroviralen Therapie feststellen<sup>92</sup>. Diese Beobachtungen waren zudem unabhängig vom HCV-Genotyp und der HCV-Virämie.

## 1.4 Mechanismen der HIV-vermittelten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Depletion

Das wesentliche immunologische Charakteristikum der HIV-Infektion ist der graduelle Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Vor allem in der akuten Phase der Infektion kommt es zu einem rapiden Abfall der T-Helferzellen im Blut. Dieser ist hauptsächlich auf die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Lymphgewebe und im lymphatischen Gewebe des Magen-Darm Trakts zurückzuführen.

Beobachtungen und Modellrechnungen deuteten jedoch daraufhin, dass sich die sukzessive Abnahme der T-Helferzellen nicht allein mit der viralen Replikation und den zytopathischen Effekten des Virus auf die Wirtszelle erklären lassen. Vielmehr zeigte sich, dass der Anteil HIV-infizierter T-Helferzellen im Blut mit < 1 % relativ gering ist<sup>93,94</sup>.

In gesunden Individuen wird die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl durch ein fließendes Gleichgewicht zwischen Neubildung und Zelltod reguliert. Ein Bestandteil der T-Zell-Homöostase ist die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods, die als Mechanismus zur Elimination von aktivierten T-Zellen dient<sup>60,95</sup>. Dem gegenüber steht die stetige Neubildung und Reifung von T-Helferzellen im Thymus. Beide Mechanismen sind durch die chronische HIV-Infektion gestört und scheinen anteilig am sukzessiven Verlust der T-Helferzellen beteiligt zu sein.

### 1.4.1 T-Zell-Neubildung im Thymus

Die Entstehung neuer immunokompetenter T-Zellen erfolgt in mehreren Schritten in den primären lymphatischen Organen. Vorläufer der T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern von dort in den Thymus. Dort erfolgt die Differenzierung und Reifung der Progenitor-Zellen in der Mehrheit zu CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung reifer T-Zellen ist die Bildung des T-Zell-Rezeptors. Dieser entsteht infolge einer genetischen Rekombination, in der verschiedene Gene, die für den T-Zell-Rezeptor kodieren, kombiniert werden. Im Zuge der genetischen Neuordnung entstehen stabile extrachromosomale Schnittprodukte, sogenannte „*T cell receptor excision circles*“ (TRECs)<sup>96,97</sup>. Diese episomale DNA wird bei der Mitose nicht repliziert und im Zuge jeder weiteren Zellteilung verdünnt. Aufgrund dieser Eigenschaften ist über die quantitative Bestimmung der TREC-Konzentration im peripheren Blut eine Aussage über die Emigration der im Thymus differenzierten T-Zellen möglich, die entsprechend als RTE (*engl. recent thymic emigrants*) bezeichnet werden. Die Bestimmung der RTE gilt als guter Indikator für die Funktion des Thymus<sup>98</sup>. Die aus dem Thymus ausgewanderten T-Zellen zirkulieren nachfolgend zwischen Blut und den peripheren lymphatischen Organen.

### 1.4.2 CD4<sup>+</sup> T-Zell-Neubildung bei der HIV-Infektion

Douek *et al.* konnten 1998 erstmals zeigen, dass eine chronische HIV-Infektion mit einer verringerten Produktion von reifen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Thymus assoziiert war<sup>99</sup>. Eine effektive antiretrovirale Therapie konnte diesen Effekt teilweise wieder rückgängig machen<sup>100,101</sup>. Weitere Studien wiesen zudem daraufhin, dass eine virale Replikation des Virus auch im Thymus stattfindet und somit die Bildung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus beeinflusst<sup>102,103</sup>.

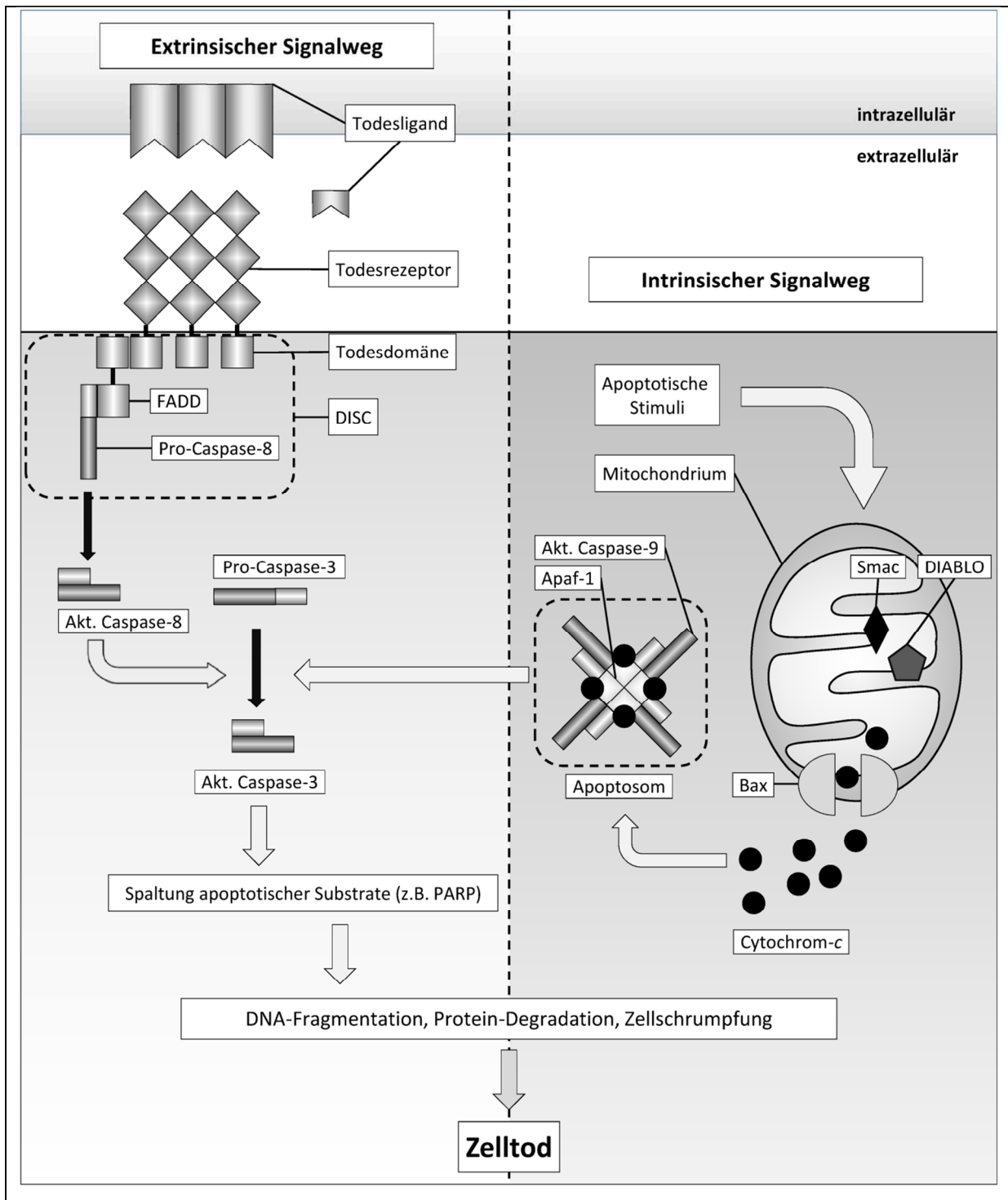
### 1.4.3 Apoptose – Initiation und Ablauf

Die Apoptose ist ein streng regulierter Prozess und Bestandteil des zellulären Stoffwechsels. Von der Zelle selbst aktiv eingeleitet, unterscheidet sich die Apoptose von der Nekrose durch das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion und der Schädigung benachbarten Gewebes. Apoptotische Zellen durchlaufen charakteristische physiologische und morphologische Veränderungen. Die frühe Phase der Apoptose zeichnet sich durch Zellschrumpfung und einer Kondensation des Chromatins (Pyknose) aus. Im weiteren Verlauf kommt es zur Abschnürung von Membran-umschlossenen apoptotischen Körperchen, die von Makrophagen oder von den umgebenden Parenchymzellen aufgenommen werden.

Eine Rolle in diesem Prozess spielen die Caspasen (**C**ystein-abhängige **A**spartat-spezifische **P**roteasen). In der Zelle liegen sie als inaktive Pro-Caspasen vor und werden im Zuge der Apoptose durch proteolytische Spaltung aktiviert. Als Initiatoren und Exekutoren haben sie eine zentrale Bedeutung beim kontrollierten Ablauf der apoptotischen Kaskade.

Die Einleitung von Apoptose lässt sich grundsätzlich in zwei Hauptwege unterteilen, den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg (Abbildung 1.4). Ein weiterer Mechanismus der Apoptoseinduktion wird über T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und Perforin/Granzym ausgelöst. Alle drei Signalwege konvergieren zu einem gemeinsamen exekutiven Signalweg. Dieser beginnt mit der Aktivierung der Caspase-3 und führt zu DNA-Fragmentation, Degradation des Zytoskeletts und nukleärer Proteine (z.B. PARP) sowie zur Expression von Liganden für Rezeptoren phagozytierender Zellen.

Der **intrinsische Signalweg** wird durch eine Reihe nicht-Rezeptor-vermittelnden Stimuli initiiert, die zur Aktivierung von pro-apoptotischen BH3-only Proteinen führen, welche daraufhin zu den Mitochondrien rekrutiert werden. Dort vermitteln sie die Porenformation in der Mitochondrienmembran durch die Proteine Bak und Bax, welche schließlich zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung einer Gruppe von pro-apoptotischen Proteinen (z.B. Cytochrom *c*, Smac/DIABLO, AIF, CAD) führt.



**Abb. 1.4: Signalwege der Apoptose.**

Apoptose lässt sich über zwei Hauptwege induzieren. Neben dem intrinsischen Signalweg, der durch intrazelluläre Stressfaktoren induziert wird, wird der extrinsische Signalweg durch die Rezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose charakterisiert. Membranöse und lösliche Formen von sog. Todesliganden (FasL, TRAIL, TNF- $\alpha$ ) binden an ihre korrespondierenden Rezeptoren (Fas, DR4/5, TNF- $\alpha$ -R1) und führen zur Trimerisierung und Bildung des „Death-inducing signaling complex (DISC)“. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8, die wiederum die zentrale Effektor-Caspase-3 aktiviert. Die Aktivierung von Caspase-3 ist ebenfalls über den intrinsischen Weg möglich. Durch verschiedene pro-apoptotische Stimuli wie Strahlung oder Toxine kommt es zur Freisetzung von Cytochrom-c und weiterer pro-apoptotischer Proteine (Smac, DIABLO). Diese vermitteln die Bildung eines Proteinkomplexes aus Caspase-9, Apaf-1 und Cytochrom-c (Apoptosom), welcher über die Initiator Caspase-9 zur Aktivierung der Caspase-3 führt. Durch Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen kommt es zur Spaltung apoptotischer Substrate und zur DNA-Fragmentation (Verändert nach <sup>105</sup>).

Neben pro-apoptischen Stimuli wie radioaktive Strahlung, Toxine und Hypoxie führt auch das Ausbleiben von Signalen von Hormonen und Wachstumsfaktoren zur Initiation des intrinsischen Signalwegs.

Das Hauptmerkmal des **extrinsischen Signalwegs** ist die Rezeptor-vermittelte Initiation der Apoptose<sup>104</sup>. Die Bindung sogenannter Todesliganden an ihre korrespondierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt zur Trimerisierung der Rezeptoren und zur Induktion von Apoptose.

Die Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Superfamilie und besitzen als gemeinsames Merkmal eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne sowie eine ca. 80 AS lange intrazelluläre Domäne, die als Todesdomäne (*engl. death domain*) bezeichnet wird und für die intrazelluläre Weiterleitung des pro-apoptischen Stimulus essentiell ist. Bekannte und gut charakterisierte Todesrezeptoren sind Fas, die TRAIL (*engl. TNF-related apoptosis inducing ligand*)-Rezeptoren 1 und 2 (*engl. death receptor 4/5, DR4/5*) sowie der TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1 (TNF- $\alpha$ -R1). Dem gegenüber stehen die korrespondierenden Liganden Fas-Ligand (FasL), TRAIL und TNF- $\alpha$ .

#### 1.4.4 CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei der HIV-Infektion

Anfang der neunziger Jahre gab es erste Hinweise, dass eine verstärkte Induktion von Apoptose mit der HIV-Infektion assoziiert sein könnte<sup>106,107,108,109,110</sup>. Insbesondere nicht-infizierte T-Helferzellen („*Bystander cells*“) sollen infolge einer fortwährenden Immunaktivierung durch Apoptose geschädigt werden<sup>111</sup>.

Bei HIV-positiven Individuen konnten daraufhin mehrere Mechanismen identifiziert werden, die zu einer erhöhten Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führen.

So trägt der Aktivierungs-induzierte Zelltod (*engl. "activation induced cell death", AICD*) zum Verlust von aktivierten T-Helferzellen bei HIV-Infektion bei. Weiterhin können HIV-Proteine, wie Tat und Env, direkt mit Lymphozyten interagieren und Apoptose einleiten<sup>112,113,114,115,116</sup>. Ein weiteres Beispiel ist die Schädigung von *Bystander cells* durch die HIV-induzierte Sekretion der Todesrezeptor-Liganden TRAIL und FasL<sup>117</sup>. Insbesondere die Interaktion zwischen Fas und seinem korrespondierenden Liganden FasL wird durch die chronische Infektion mit HIV beeinflusst: Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der HIV-Infektion und den Veränderungen des Fas/FasL-Systems aufzeigen und lassen eine wichtige Rolle der Apoptose bei der HIV-Pathogenese vermuten<sup>118,119,120</sup>.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Inwieweit eine Koinfektion mit HCV Einfluss auf die Progression der HIV-Infektion nimmt, ist bislang immer noch unklar. Die bislang veröffentlichten Studien zeichnen ein komplexes und uneinheitliches Bild. So ließ sich bei Patienten mit maximaler Suppression der HIV-Replikation in der Mehrheit der Beobachtungen kein Unterschied bezüglich der Immunrekonstitution zwischen einer HIV-Mono- und einer HIV/HCV-Koinfektion feststellen. Dagegen wurde bei unbehandelten HIV-Patienten eine signifikante Assoziation zwischen einer HCV-Koinfektion und einem beschleunigten klinischen Verlauf der HIV-Infektion beobachtet.

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl, als wichtigste immunologische Kenngröße für den klinischen Verlauf der HIV-Infektion, wird sowohl durch den Tod als auch durch die Neubildung von T-Helferzellen bestimmt. Beide Mechanismen der T-Zellhomöostase sind durch die chronische HIV-Infektion beeinträchtigt und werden möglicherweise durch eine HCV-Koinfektion weiter beeinträchtigt.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Auswirkungen einer Koinfektion mit HCV auf den Zelltod und die Neubildungsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen und die Ergebnisse in Zusammenhang mit dem bislang beschriebenen klinischen Verlauf der HIV/HCV-Koinfektion zu setzen. Des Weiteren sollte anhand der beiden Parameter analysiert werden, inwieweit sich eine Hepatitis C auf die Immunrekonstitution unter einer antiretroviralen Kombinationstherapie auswirkt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zuerst die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion bestimmt werden und diese im Vergleich zu HIV- und HCV-monoinfizierten Patienten sowie gesunden Probanden betrachtet werden. Vorangegangene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass sowohl eine HIV- als auch eine HCV-Monoinfektion mit einem verringerten Anteil der kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten T-Helferzellen assoziiert waren. Die Auswirkungen einer HIV/HCV-Koinfektion auf die Neubildungsrate wurden allerdings bisher noch nicht umfassend untersucht.

Der zweite Teil dieser Dissertation sollte sich mit der Apoptose von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschäftigen. Die HIV-Infektion ist mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate der T-Helferzellen assoziiert. Somit stellt der Untergang von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Apoptose einen wichtigen Mechanismus dar, der zur fortschreitenden Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. Daher sollte überprüft werden, ob sich eine Koinfektion mit dem Hepatitis C-Virus auf die Apoptoserate der T-Helferzellen in HIV-positiven Patienten auswirkt.

Die HIV-vermittelte Induktion von Apoptose kann über direkte als auch indirekte Wege erfolgen. Eine zentrale Bedeutung nimmt dabei die Rezeptor-vermittelte Induktion der Apoptose ein. Die Expression der Rezeptoren sowie der induzierenden Liganden scheint sowohl bei der HIV- als auch bei der HCV-Monoinfektion verändert zu sein. Abschließend sollte daher untersucht werden, welche

Rolle die einzelnen Mechanismen bei der Induktion der Apoptose in Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion spielen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sollten darüber hinaus helfen, die teilweise widersprüchlichen Befunde bisheriger klinischer Studien über den Verlauf der HIV-Infektion bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion zu erklären. Zudem sollte versucht werden einen möglichen Zusammenhang zwischen einer potentiell veränderten Immunpathogenese auf zellulärer Ebene und dem klinischen Verlauf der Koinfektion herzustellen.

## 2 MATERIAL

Nachfolgend sind in alle bei der Durchführung der Experimente verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Hersteller aufgeführt.

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer, Wesel, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Serie 300, 165 l	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Feinwaage, Micro MC5	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer FacsCalibur	BD, Mönchengladbach, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop Typ DMIL	Leitz, Köln, Deutschland
Kühlzentrifuge	Beckman, München, Deutschland
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Mikrozentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vario-MACS™ Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Plattenschüttler Typ MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Sterilbank BSB4A	Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland
Sterilisator Typ F-60	Dr. Gruß K.G., Neuss, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Osterode, Deutschland
Vortexer Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

### 2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
AB-Serum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ampuwa (steriles Aqua dest.)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Auslaufpipette (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CellFix (Fixierlösung)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cytoperm/Cytofix	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Digitonin (Feststoff)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Einmalfiltrationsgeräte	Nunc International, Wiesbaden, Deutschland
Einweg-Handschuhe (SafeSkin)	Kimberly-Clarke, Roswell, GA, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll-Separationsmedium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
L-Glutamin RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
LightCycler™ Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Eich, Heidelberg, Deutschland



Produkt	Hersteller
Paraformaldehyd (Feststoff)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS ( <i>engl. phosphate buffered saline</i> ), pH 7,4	Apotheke der Uniklinik Bonn, Deutschland
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Polystyren-FACS-Röhrchen (5ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Primer (Echtzeit-PCR)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Trypanblau (Feststoff)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sonden (Echtzeit-PCR)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

## 2.3 Antikörper

Name	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller
Anti-akt.Caspase-3	FITC	C92-605	Hase, IgG	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD178 (FasL)	FITC	Alf-2.1a	Maus, IgG <sub>1</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-CD3	PerCP	SK7	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD4	APC	RPA-T4	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD8	APC	SK1	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD95 (Fas)	PE	DX2	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-cleaved-PARP	FITC	Polyklonal	Hase, IgG	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Histidin	unkonjugiert	AD1.1.10	Maus, IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Minneapolis, USA
Isotyp-Kontrolle 1	FITC	MOPC-21	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland
Isotyp-Kontrolle 2	PE	MOPC-21	Maus, IgG <sub>1</sub> κ	BD, Heidelberg, Deutschland

## 2.4 Puffer und Medien

Name	Zusammensetzung
Komplettmedium 1 (Kultivierung PBMC)	RPMI 1640, 5 % (v/v) autologes Serum, 1 % (v/v) P/S
Komplettmedium 2 (Apoptose-Induktion)	RPMI 1640, 5 % (v/v) AB-Serum, 1 % (v/v) P/S
MACS-Puffer	PBS, 0,5 % (w/v) BSA, 2 mM EDTA
PBS ( <i>engl. phosphate buffered saline</i> )	H <sub>2</sub> O, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,0276 % (w/v) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O 0,2864 % (w/v) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O, pH 7,3
PBSF	PBS, 0,01 % (v/v) NaN <sub>3</sub> , 2,5% (v/v) FCS

## 2.5 Kits

Name	Hersteller
APO-DIRECT Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
FasL (CD178) ELISA Kit	Diaclone, Besancon Cedex, Frankreich
FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Qiagen DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TNF-α ELISA Kit	Diaclone, Besancon Cedex, Frankreich
TRAIL (CD253) ELISA Kit	Diaclone, Besancon Cedex, Frankreich

## 2.6 Patienten

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studie wurden insgesamt 296 Patienten und 33 gesunde Probanden rekrutiert. Die Studienteilnehmer stammten aus der Immunologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I und der Ambulanz des Institutes für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn sowie aus dem Zentrum für HIV und Hepatogastroenterologie in Düsseldorf. Alle Studienteilnehmer wurden über Art und Ziel der Studie aufgeklärt und hatten schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung des Patientenmaterials für wissenschaftliche Zwecke gegeben. Die Studie war von der Ethik-Kommission der Universität Bonn entsprechend den Ethik-Richtlinien der Deklaration von Helsinki (2008) begutachtet und genehmigt worden.

Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten handelt es sich um 168 HIV-monoinfizierte und 91 HIV/HCV-koinfizierte Patienten sowie 37 HCV-Monoinfizierte. Von diesen wurden 70 HIV-Monoinfizierte und 51 HIV/HCV-Koinfizierte zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses bereits mindestens ein Jahr lang mit einer HAART behandelt und wiesen konsistent keine detektierbare Viruslast für mindestens ein Jahr auf ( $< 50$  Kopien/ml). Alle HIV-positiven Patienten sind mit HIV-1 infiziert. Alle HCV-positiven Patienten hatten mindestens ein Jahr vor Einschluss keine antivirale HCV-Therapie erhalten.

Von allen Studienteilnehmern wurde im Rahmen jeder Blutabnahme 10 - 20 ml heparinisiertes Vollblut und/oder 10 ml Vollblut für die Gewinnung von autologem Serum abgenommen. Zusätzlich zur Querschnittsuntersuchung wurden 8 HIV-Monoinfizierte und 5 HIV/HCV-Koinfizierte im Verlauf ihrer ersten HAART untersucht. Die Blutabnahmen erfolgten hierbei zu Beginn der Therapie (Baseline) sowie nach 4 und 12 Wochen.

Zum Zeitpunkt jeder Blutabnahme wurden die entsprechenden demographischen Daten (Alter, Geschlecht) sowie von allen Patienten weitere klinische Daten bestimmt. Tabelle 2.1 gibt eine Zusammenfassung aller relevanten demographischen und klinischen Daten wieder.

Tab. 2.1: Demographische und klinische Daten der Patientengruppen

	gesunde Probanden	HCV+	HIV+		HIV+/HCV+	
			HIV-RNA(+)	HIV-RNA(-)	HIV-RNA(+)	HIV-RNA(-)
Anzahl	33	37	98	70	40	51
Geschlecht						
männlich <sup>a)</sup>	14 (42,4)	23 (62,2)	82 (83,7)	55 (78,6)	35 (88,9)	42 (82,3)
weiblich <sup>a)</sup>	19 (57,6)	14 (37,8)	16 (16,3)	15 (21,4)	5 (11,1)	9 (17,7)
Alter (Jahre) <sup>a), b)</sup>	31 (21-51)	42 (19-78)	40 (20-67)	45 (27-70)	42 (25-63)	43 (30-72)
<b>Risikofaktoren</b>						
i.v. Drogenabusus	-	7 (18,9)	4 (4,1)	4 (5,7)	21 (52,5)	16 (31,4)
Hämophilie	-	2 (5,4)	3 (3,0)	4 (5,7)	6 (15,0)	13 (25,5)
MSM	-	0 (0,0)	48 (49,0)	27 (38,6)	7 (17,5)	5 (9,8)
heterosexuell	-	0 (0,0)	18 (18,4)	14 (20,0)	1 (2,5)	4 (7,8)
Endemisch	-	0 (0,0)	10 (10,2)	8 (11,4)	2 (5,0)	0 (0,0)
Unbekannt/andere	-	28 (75,7)	15 (15,3)	13 (18,6)	3 (7,5)	13 (25,5)
<b>HIV-Status</b>						
HIV-Last <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	12.919	≤50 <sup>e)</sup>	8,920	≤50 <sup>e)</sup>
(Kopien/ml)			(53-750.000)		(56-548.060)	
CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Zahl <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	371	502	350	422
(Zellen/μl)			(11-1467)	(134-1890)	(5-1009)	(23-1116)
CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Zahl <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	856	818	923	721
(Zellen/μl)			(193-2261)	(110-2374)	(324-2229)	(23-2106)
cART <sup>a) f)</sup>	-	-	23 (23,5)	70 (100)	13 (32,5)	51 (100)
PI-basiert <sup>a) g)</sup>	-	-	13 (56,5)	39 (55,7)	8 (61,5)	35 (68,6)
Nicht PI-basiert <sup>a) g)</sup>	-	-	10 (43,5)	31 (44,3)	5 (38,5)	16 (31,4)
<b>HCV-Status</b>						
HCV-Last <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	1.282	-	-	2.439	2.142
(x10 <sup>3</sup> IU/ml)		(4,4-21.377)			(19-96.000)	(0,4-85.000)
HCV-Genotyp 1 <sup>a)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	22(59,5)	-	-	21 (52,5)	33 (45,8)
HCV-Genotyp 2 <sup>a)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	0 (0,0)	-	-	2 (5,0)	0 (0,0)
HCV-Genotyp 3 <sup>a)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	4 (10,8)	-	-	6 (15,0)	8 (11,1)
HCV-Genotyp 4 <sup>a)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	0(0,0)	-	-	5 (12,5)	7 (9,7)
unbekannt	n.a. <sup>d)</sup>	13 (29,7)	-	-	6 (15,0)	24 (33,3)
ALT (U/ml) <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	70 (19-374)	27 (10-411)	28 (13-148)	57 (17-594)	58 (15-830)
AST (U/ml) <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	41 (13-274)	28 (9-1014)	33 (14-598)	51 (21-3515)	58 (15-916)
γ-GT (U/ml) <sup>c)</sup>	n.a. <sup>d)</sup>	58 (17-274)	28 (9-567)	44 (15-511)	67 (15-308)	82 (22-855)

<sup>a)</sup> Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), <sup>b)</sup> Mittelwert (Minimum-Maximum), <sup>c)</sup> Median (Minimum-Maximum), <sup>d)</sup> nicht analysiert, <sup>e)</sup> Viruslast unterhalb des Detektionslimits von 50 Kopien/ml, <sup>f)</sup> Patienten, die eine antiretrovirale Kombinationstherapie erhielten, <sup>g)</sup> Gesamtzahl entspricht Anzahl cART-behandelter Patienten

Für die Analyse der *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate wurden insgesamt 84 HIV-Patienten eingeschlossen. 45 dieser Patienten erhielten eine effektive HAART und zeigten konsistent über ein Jahr keine nachweisbare HIV-Last (< 50 Kopien/ml). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die Charakteristika dieser Patientengruppe und die eingesetzten Medikamente, stratifiziert nach einer Protease-Inhibitor (PI)-basierten Therapie und einer Therapie ohne PI.

**Tab. 2.2: Charakteristika ausgewählter cART-behandelter Patienten**

	cART gesamt	cART PI-basiert	cART Nicht PI-basiert <sup>c)</sup>
Anzahl	45	31	14
Geschlecht			
männlich <sup>a)</sup>	32 (71,1)	24 (77,4)	8 (57,2)
weiblich <sup>a)</sup>	13 (28,9)	7 (22,6)	6 (42,8)
Alter (Jahre) <sup>b)</sup>	42 (27-69)	42 (27-69)	44 (30-55)
HCV-Koinfektion <sup>a)</sup>	23 (51,1)	17 (54,8)	6 (42,9)
<b>Protease-Inhibitor (PI)</b>			
Atazanavir <sup>a)</sup>	9 (20,0)	9 (29,0)	-
Lopinavir/Ritonavir <sup>a)</sup>	19 (42,3)	19 (61,3)	-
Saquinavir <sup>a)</sup>	2 (4,4)	2 (6,5)	-
Ritonavir + PI <sup>a)</sup>	5 (11,1)	5 (16,1)	-
Fosamprenavir <sup>a)</sup>	1 (2,2)	1 (3,2)	-
<b>NNRTI</b>			
Efavirenz <sup>a)</sup>	9 (20,0)	-	9 (64,3)
<b>NRTI</b>			
Tenofovir <sup>a)</sup>	32 (71,1)	24 (77,4)	8 (57,1)
Emtricitabin <sup>a)</sup>	24 (53,3)	17 (54,8)	7 (50,0)
Lamivudin <sup>a)</sup>	24 (53,3)	16 (51,6)	8 (57,1)
Abacavir <sup>a)</sup>	12 (26,7)	7 (22,6)	5 (35,7)
Zidovudin <sup>a)</sup>	5 (11,1)	0 (0,0)	5 (35,7)

<sup>a)</sup> Anzahl (Anzahl/Gesamtanzahl [%]), <sup>b)</sup> Mittelwert (Minimum-Maximum), <sup>c)</sup> enthalten an Stelle eines PI einen weiteren NRTI oder zusätzlich einen NNRTI

### 3 METHODEN

#### 3.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden nach der von Böyum entwickelten Methode der Dichtegradienten-Zentrifugation aus heparinisierem Blut separiert<sup>121</sup>.

##### 3.1.1 Prinzip

Bei dieser Methode werden die Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Dichte und Aggregationsverhalten getrennt. Prinzipiell erfolgt die Auftrennung durch Überschichten antikoagulierten Bluts auf eine Trennlösung aus Zuckern oder synthetischen Polymeren und anschließender Zentrifugation. Zur Separation der PBMC wurde in dieser Arbeit das synthetische Polysaccharid Ficoll verwendet, ein neutrales, stark verzweigtes Polymer aus Saccharose-Monomeren und Epichlorhydrin (Dichte: 1,077 g/cm<sup>3</sup>). Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren durch Aggregatbildung und Zentrifugation am Boden des Zentrifugenröhrchens. Dagegen bilden Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer minimal geringeren Dichte gegenüber der Trennlösung eine Interphaseschicht oberhalb der Ficoll-Lösung. Der darüber liegende Überstand besteht vorwiegend aus Plasma, Medium/PBS und Thrombozyten.

##### 3.1.2 Durchführung

Antikoagulieretes Blut wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit PBS verdünnt und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen über 15 ml Ficoll-Lösung vorsichtig aufgeschichtet. Nach anschließender Zentrifugation (950 g, 20 min, Raumtemperatur (RT), ohne Bremse) wurde die Interphase mit einer Glas-Pasteurpipette abgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und dann erneut zentrifugiert (500 g, 15 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und erneut gewaschen (Zentrifugation: 300 g, 10 min, RT). Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das Pellet für die anschließende Zellzahlbestimmung in 10 ml PBS resuspendiert.

### 3.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl isolierter PBMC wurde lichtmikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die aus einem gravierten Glas-Objektträger und einem Deckglas bestehende Zählkammer ist in 4 Großquadrate mit jeweils einer Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  unterteilt. Bei einer Kammertiefe von  $0,1 \text{ mm}$  beträgt das Flüssigkeitsvolumen innerhalb eines Großquadrats  $0,1 \mu\text{l}$ .

Um das Einbeziehen nicht-vitaler Zellen in die Zellzählung auszuschließen, wird die eingesetzte Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung ( $0,025 \%$  (w/v) in Aqua dest.) verdünnt. Das Zytoplasma toter Zellen lässt sich mit Trypanblau aufgrund einer nicht mehr intakten Zytoplasmamembran blau anfärben. Die Berechnung der Zellkonzentration ergibt sich aus der Anzahl der Zellen in einem Großquadrat und dem Verdünnungsfaktor und folgt der Formel  $n_1$ :

$$\text{Zellzahl pro Großquadrat} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10 = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$$

### 3.3 Immunmagnetische Isolation von $\text{CD4}^+$ T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen durch immunmagnetische Separation aus PBMC von Patienten und gesunden Probanden gewonnen. Hierfür wurde das  $\text{CD4}^+$  T Cell Isolation Kit II der Firma Miltenyi verwendet.

Bei dieser Methode werden bestimmte Zellpopulationen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln isoliert. Die Markierung der Zellen erfolgt dabei über biotinylierte Antikörper, die spezifisch Oberflächenproteine der Zielzellen erkennen und über einen Biotin-spezifischen Sekundär-Antikörper, der mit einem magnetisch detektierbarem Kügelchen (*engl. magnetic bead*) konjugiert ist. Die markierten Zellen werden dann in einem magnetischen Feld in einer Säule festgehalten, während unmarkierte Zellen als Eluat die Säule passieren. Prinzipiell lassen sich zwei Arten der Separation unterscheiden. Bei einer Positiv-Isolation wird die gewünschte Zellpopulation selektiv mit einem spezifischen Antikörper markiert und von den im Eluat befindlichen Zellen separiert. Im umgekehrten Fall, einer Negativ-Isolation, erfolgt die Separation durch die Markierung aller unerwünschten Zellen durch ein Antikörpergemisch. Die unmarkierten Zielzellen befinden sich demnach im Eluat.

Nach Durchführung der Negativ-Selektion entsprechend den Herstellerangaben wurde die Reinheit der separierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (anti-CD3 und anti-CD4) durchflusszytometrisch bestimmt.

### 3.4 DNA-Extraktion

Die Extraktion von genomischer DNA aus isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Qiagen DNA Blood Mini Kit. Bei dem angewandten Verfahren werden die Zellen zuerst mit Detergenzien aufgeschlossen und Proteine durch Proteinase K denaturiert. Im Anschluss erfolgt die Bindung der freiwerdenden DNA an eine Silica-Säule. Die Bindung ist selektiv und reversibel. Durch wiederholtes Zentrifugieren und Waschen mit speziellen Puffern wird die DNA gereinigt (Abscheiden von RNA) und anschließend in Aqua dest. eluiert.

### 3.5 Echtzeit-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Echtzeit-PCR (*engl. quantitative real time PCR*) zum Nachweis und zur Quantifizierung von *T cell receptor excision circles* (TRECs) sowie des CCR5-Gens angewendet. Die Durchführung erfolgte mit dem LightCycler® 2.0 System der Firma Roche Diagnostics.

#### 3.5.1 Prinzip

Die Echtzeit-PCR ist eine Weiterentwicklung der klassischen PCR. Sie ermöglicht es, während der Amplifikation die Zunahme der PCR-Produkte zu detektieren und zu quantifizieren. Dies geschieht mit Hilfe einer photometrischen Messung von Fluoreszenz während der Reaktion. Erzeugt wird diese durch DNA-interkalierende Fluoreszenz-Farbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid oder SYBR®Green. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei abhängig von der Menge des entstehenden PCR-Produkts. Weiterhin kommen fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Sonden zur Anwendung, die unter Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) oder Quenching bei Vorliegen von komplementären DNA-Fragmenten ein Fluoreszenzsignal erzeugen.

#### 3.5.2 Nachweis des CCR5-Gens von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Quantifizierung des CCR5-Gens in einer DNA-Probe diente indirekt zur Bestimmung der eingesetzten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl. 2 Kopien des CCR5-Gens entsprechen dabei einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle. Der Nachweis des Gens erfolgte mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kits auf dem LightCycler® 2.0 System. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR®Green eingesetzt. Als Probe wurde isolierte genomische DNA aus separierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Tabellen 3.1-3 geben die DNA-Sequenz der eingesetzten Primer, den Reaktionsansatz, sowie das PCR-Programm an.

Tab. 3.1: CCR5-Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz
Vorwärts-Primer	5'-TGC TAC TCG GGA ATC ATA AAA ACT-3'
Rückwärts-Primer	5'-TTC TGA ACT TCT CCC CGA CAA A-3'

Tab. 3.2: Schema des Reaktionsansatzes (CCR5)

	Volumen (in $\mu$ l)	Endkonzentration
Vorwärts-Primer (5 $\mu$ M)	1	0,5 $\mu$ M
Rückwärts-Primer (5 $\mu$ M)	1	0,5 $\mu$ M
Enzym-Mix	2	-
DNA-Probe	1	-
H <sub>2</sub> O	5	-
Gesamtvolumen	10	-

Der Reaktionsansatz wurde in Glas-Kapillaren pipettiert, verschlossen und für 5 s bei 700 g zentrifugiert. Als Negativ-Kontrolle wurde anstelle von DNA 1  $\mu$ l Aqua dest. zugefügt.

Tab. 3.3: Protokoll des PCR-Programms (CCR5)

Schritt	Temperatur	Zeit	Steigung ( $^{\circ}$ C/s)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 $^{\circ}$ C	10 min	-	1
<u>Amplifikation</u>				
Denaturierung	95 $^{\circ}$ C	10 s	20	50
Annealing	60 $^{\circ}$ C	10 s	20	
Elongation	72 $^{\circ}$ C	20 s	20	
Abkühlung	40 $^{\circ}$ C	30 s	20	1

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte am Ende des Annealing-Schritts.

### 3.5.3 Nachweis von TRECs aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten Thymozyten (*engl. recent thymic emigrants, RTE*) wurde 1998 entwickelt und erlaubt Rückschlüsse auf die Neubildungsrate der T-Zellen.<sup>99</sup> Die Methode basiert auf der Messung von *T cell receptor excision circles* (TRECs). TRECS sind stabile extrachromosomale Schnittprodukte, die bei der genetischen Neuordnung im Zuge des Re-Arrangements der Gene zum fertigen T-Zell-Rezeptor gebildet werden. Diese episomale DNA wird bei der Mitose nicht repliziert und wird im Zuge jeder weiteren Zellteilung verdünnt.



Im ersten Rekombinationsschritt der T-Zell-Rezeptorbildung entsteht der sog. *signal joint* TREC (sjTREC). Der Nachweis von sjTRECs in einer DNA-Probe erfolgte mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master<sup>plus</sup> HybProbe-Kit auf dem LightCycler® 2.0 System. Für die Messung der Fluoreszenz wurden Fluorochrom Anker- und Sensor-Sonden eingesetzt. Als Probe wurde isolierte genomische DNA aus separierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Tabellen 3.4-6 geben die DNA-Sequenz der eingesetzten Primer, den Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm an.

**Tab. 3.4: Sequenzen der sjTREC-Primer und Sonden**

Primer/Sonde	Sequenz
Vorwärts-Primer	5' CTC TCC AAG GCA AAA TGG G 3'
Rückwärts-Primer	5' GTG GTC TGT GCT GGC ATC 3'
Anker-Sonde (LC red640)	LC-640-AAA ACC AGA GGT GTC AGC ATG GT—PH
Sensor-Sonde (Fluor)	CCA CAG GAG TGG GCA CCT TTA C—FL

**Tab. 3.5: Schema des Reaktionsansatzes (sjTREC)**

	Volumen (in µl)	Endkonzentration
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,6	0,60 µM
Rückwärts-Primer (5 µM)	0,6	0,30 µM
Anker-Sonde (5 µM)	0,5	0,25 µM
Sensor-Sonde (5 µM)	0,3	0,15 µM
Reaktionsmix	2	-
DNA-Probe	2	-
H <sub>2</sub> O	2	-
Gesamtvolumen	10	-

Der Reaktionsansatz wurde in Glas-Kapillaren pipettiert, verschlossen und für 5 s bei 700 g zentrifugiert. Als Negativ-Kontrolle wurden anstelle von DNA 2 µl Aqua dest. zugefügt.

**Tab. 3.6: Protokoll des PCR-Programms (sjTREC)**

Schritt	Temperatur	Zeit	Steigung (°C/s)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	-	1
<u>Amplifikation</u>				
Denaturierung	95 °C	5 s	20	45
Annealing	53 °C	5 s	20	
Elongation	72 °C	11 s	20	
<u>Schmelzkurve</u>				
	95 °C	5 s	20	1
	65 °C	15 s	20	
	95 °C	0 s	0,1	
Abkühlung	40 °C	30	20	1

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im Anschluss der Elongation bei 82°C.

### 3.5.4 Berechnung von RTE (*engl. recent thymic emigrants*)

Als Maß für die Neubildungsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde das Verhältnis zwischen sjTRECs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Das Verhältnis dieser beiden Größen wurde über die  $\Delta$ Ct-Methode errechnet. Der Ct-Wert (*engl. cycle threshold*) entspricht dem Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. In dieser Phase ist die Effizienz der PCR am höchsten und die Fluoreszenz steigt exponentiell an. Der Ct-Wert wurde mit Hilfe des LightCycler-Programms anhand der 2. Ableitung der Fluoreszenz bestimmt (Abbildung 3.1). Anhand der folgenden Formel lässt sich das Verhältnis zwischen sjTRECs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (RTE/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen) berechnen:

- $\Delta Ct_{RTE} = (Ct_{TREC} - Ct_{CCR5})$
- $RTE/10^5 \text{ CD4}^+ \text{ T-Zellen} = 2^{-\Delta Ct_{RTE}} * 10^5$

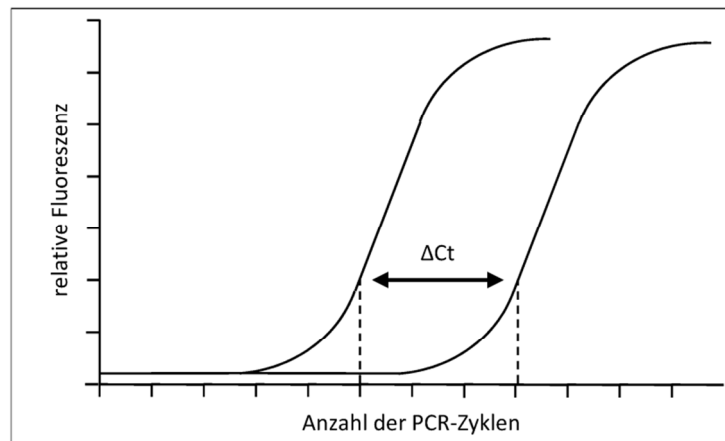


Abb. 3.1: Prinzipielle Berechnung von  $\Delta$ Ct-Werten.

### 3.6 Kurzzeit-Kultivierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Für die *ex vivo* Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose wurden isolierte PBMC von 96 Patienten (HIV n=47, HIV/HCV: n=39, HCV: n=10) und 12 gesunden Kontrollen verwendet. Die Zellen wurden in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml kultiviert. Die Inkubation erfolgte in Kompletmedium 1 (RPMI 1640, 5 % (v/v) autologes Serum, 1 % (v/v) P/S) über Nacht im Brutschrank (37°C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>). Im Anschluss wurde die Apoptoserate der Zellen durchflusszytometrisch mittels des TUNEL- und des PARP-Assays bestimmt (siehe Punkt 3.9).

### 3.7 *In vitro* Induktion der Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

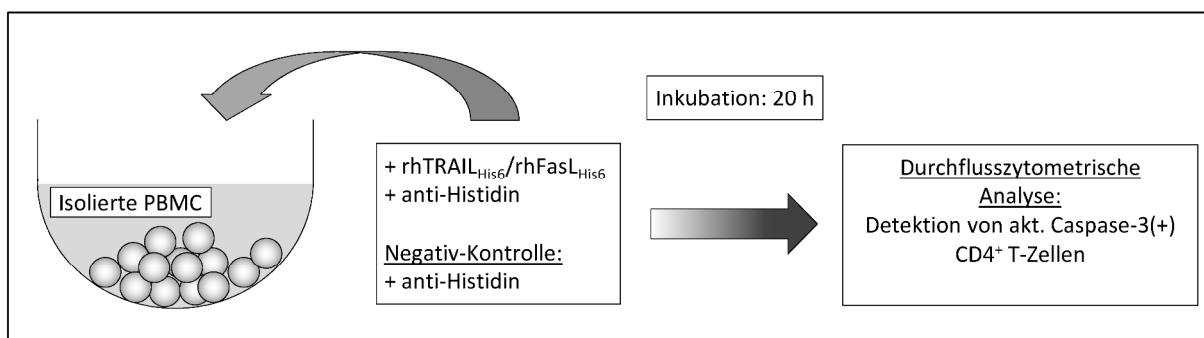
Die Induktion der Apoptose erfolgte *in vitro* durch die Koinkubation von rekombinatem humanem FasL<sub>His6</sub> (rhFasL) oder rekombinatem humanem TRAIL<sub>His6</sub> rhTRAIL mit isolierten PBMC für 20 h. Hierfür wurden PBMC von 53 Patienten (HIV: n = 23, HIV/HCV: n = 21, HCV: n = 9) und 11 gesunden Personen eingesetzt.

#### 3.7.1 Prinzip

Die Bindung des rekombinanten Todesliganden (FasL, TRAIL) an die korrespondierenden Rezeptoren Fas bzw. DR4, DR5 auf der Oberfläche der Zielzellen führt zur Trimerisierung der Rezeptoren und zur Transduktion des apoptotischen Stimulus in die Zelle. Um die biologische Wirksamkeit der Liganden zu erhöhen, wurde ein Histidin-Antikörper (10 µg/ml) zugesetzt. Die Bindung des Antikörpers an den Hexa-Histidin-Rest (His<sub>6</sub>) des Proteins führt zu einer Kreuzvernetzung des Proteins und damit zu einer verstärkten biologischen Wirksamkeit.

#### 3.7.2 Durchführung

Die Koinkubation erfolgte in einer 96 Loch-Rundbodenplatte in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Kompletmedium 2 (RPMI 1640, 5 % (v/v) AB-Serum, 1 % (v/v) P/S) über Nacht (20 h) im Brutschrank (37°C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>). Rekombinantes FasL und TRAIL wurden jeweils in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne rekombinantes Protein (Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Schematischer Versuchsaufbau der *in vitro* Induktion von Apoptose.**

Isolierte PBMC von Probanden und Patienten wurden für 20 h mit rekombinatem FasL bzw. TRAIL koinkubiert. Zusätzlich wurde ein Histidin-Antikörper hinzugefügt, der zu Kreuzvernetzung der rekombinanten Proteine über deren Hexa-Histidinrest führt. Im Anschluss erfolgte die Detektion apoptotischer Zellen über den Caspase-3 Assay.

Nach erfolgter Inkubation wurde die spezifische durch FasL oder TRAIL-induzierte Apoptoserate ( $A_I$ ) der Zellen durchflusszytometrisch mittels eines Caspase-3-Assays bestimmt (siehe Punkt 3.9). Die induzierte Apoptose ( $A_I$ ) ergibt sich aus der spontanen Apoptose ohne rekombinantes Protein ( $A_{\text{Negativ}}$ ) und der in Anwesenheit von rekombinantem FasL/TRAIL gemessenen Apoptose ( $A_{\text{FasL/TRAIL}}$ ). Sie lässt sich nach folgender Formel  $n_2$  berechnen:

$$A_I \text{ (in \%)} = 100 * (A_{\text{FasL/TRAIL}} - A_{\text{Negativ}}) / (100 - A_{\text{Negativ}})$$

### 3.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen bezüglich ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften sowie ihrer intrazellulären Komplexität. Des Weiteren ermöglicht sie den Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche und nach Permeabilisierung der Zellmembran intrazellulär. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Identifizierung von  $CD4^+$  T-Zellen, Detektion apoptotischer  $CD4^+$  T-Zellen sowie zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Fas und Fas-Ligand auf  $CD4^+$  T-Zellen angewendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse der optischen Eigenschaften von Zellen, die vereinzelt mit hoher Geschwindigkeit in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Die Passage jeder Zelle führt zur Streuung des vom Laserstrahl ausgesandten Lichts, welches auf zwei räumlich unterschiedlich angeordnete optische Detektoren trifft, die entweder das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfassen. Die photometrische Messung beider Parameter wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und erlaubt anhand der Höhe, Fläche und Weite des Spannungspulses Rückschlüsse auf verschiedene zelluläre Parameter wie Zellgröße, Zellkern und Granularität der untersuchten Zelle. Das Vorwärtsstreulicht ist dabei proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße), das Seitwärtsstreulicht dagegen proportional zur relativen Granularität.

Der Nachweis extra- und intrazellulärer Antigene erfolgt mit Hilfe Fluorochrom-konjugierter Antikörper. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrom-moleküle auf der Zelle.

In dieser Arbeit wurde für alle durchflusszytometrischen Messungen als Durchflusszytometer ein FacsCalibur (BD, Heidelberg) verwendet. Dieses Durchflusszytometer besitzt zwei Laser, mit denen die vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) anhand ihres charakteristischen Emissionsspektrums nachgewiesen werden können.

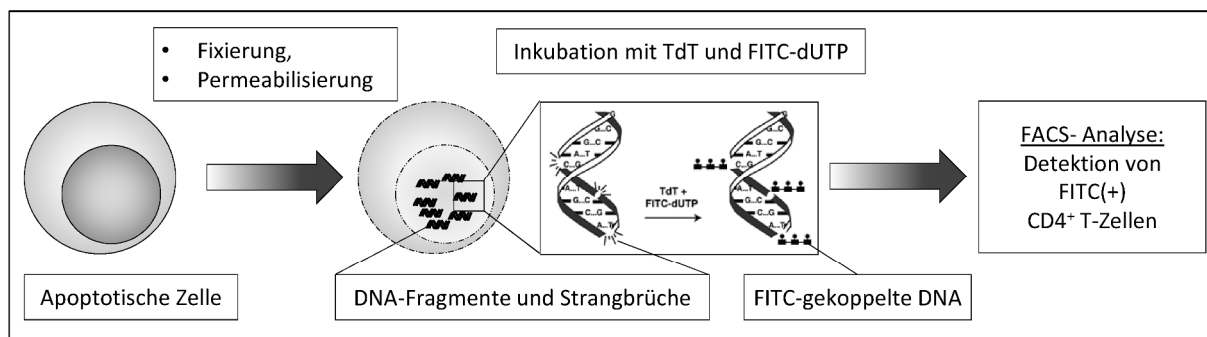
Die weitere Auswertung und graphische Aufarbeitung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der CellQuest Pro Software (BD, Heidelberg, Deutschland) und der FlowJo Software (Tristar, Ashland, Oregon, USA).

### 3.9 Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden apoptotische Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden identifiziert. Hierdurch sollten spezifisch Zellen in verschiedenen Phasen der Apoptose detektiert werden.

#### 3.9.1 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)

Für die Detektion spät-apoptotischer Zellen wurde ein kommerziell-erhältlicher TUNEL-Assay verwendet (APO-Direct Kit). Prinzip dieser Methode ist die enzymatische Kopplung von Fluorochrom- bzw. Biotin-konjugierten Nukleotiden an das 3'-OH-Ende von DNA-Fragmenten, wie sie in der Spätphase der Apoptose durch Spaltung der genomischen DNA durch Endonukleasen entstehen (Abbildung 3.3).



**Abb. 3.3: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays.**

Nach der Fixierung mit PFA und der Permeabilisierung der Zellen durch Ethanol erfolgte die Inkubation in einem Reaktionsmix, der das Enzym Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase (TdT) und Fluorochrom-gekoppeltes dUTP enthält. Durch die enzymatische Kopplung der FITC-gekoppelten Nukleotide lässt sich der Grad der DNA-Fragmentierung einer Zelle durchflusszytometrisch bestimmen (Illustration verändert nach <sup>122</sup>).

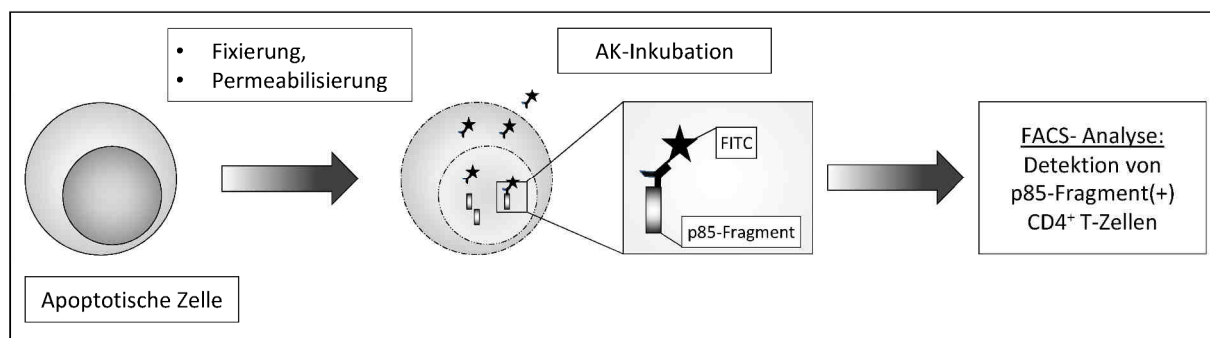
Durchführung:  $3 \cdot 10^6$  PBMC wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 20  $\mu$ l anti-CD4-APC gefärbt (15 min, RT) und einmalig mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 300 g, 5 min, 4°C). Danach wurden die Zellen mit 1 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 1 h auf Eis fixiert und danach zweimal in kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation: 500 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 70 % Ethanol aufgenommen und für mindestens 24 Std. bei -20 °C gelagert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers: Nach der Entfernung des Ethanols durch mehrere Waschschrte erfolgte die Markierung apoptotischer Zellen durch Inkubation mit FITC-konjugiertem

dUTP und der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) in 50 µl Reaktionspuffer (60 min, 37°C). Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen gestoppt und die Zellen für weitere 30 min bei Raumtemperatur mit einem RNase/Propidiumiodid (PI)-Puffer inkubiert und in dieser Form für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

### 3.9.2 Detektion des Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) p85-Fragments

In diesem Assay erfolgt die Identifizierung apoptotischer Zellen durch den Nachweis des p85-Fragments der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-Assay). PARP ist ein im Zellkern residentes DNA-Reparatur-Enzym, welches während der Apoptose im Zuge der Aktivierung der proteolytischen Enzym-Kaskade durch die aktivierte Caspase-3 in ein 24 kDa und ein 89 kDa (p85) großes Fragment geschnitten wird.

Durchführung:  $1 \cdot 10^6$  PBMC wurden mit jeweils 10 µl anti-CD3 und anti-CD4 gefärbt (15 min, RT), mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 300 g, 5 min, 4°C) und nachfolgend mit Cellfix fixiert (20 min, 4°C). Nach nochmaligem Waschen mit PBSF wurden die Zellen mit Digitonin (100 µg/ml in PBSF) permeabilisiert (30 min, 4°C). Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen mit 10 µl eines Antikörpers inkubiert (30 min, RT), der spezifisch das p85-Fragment erkennt (anti-cleaved PARP). Im Anschluss wurden die Zellen von überschüssigem Antikörper befreit (Zentrifugation: 500 g, 5 min, RT) und in 200 µl CellFIX fixiert und dann innerhalb von 2 h durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.4).



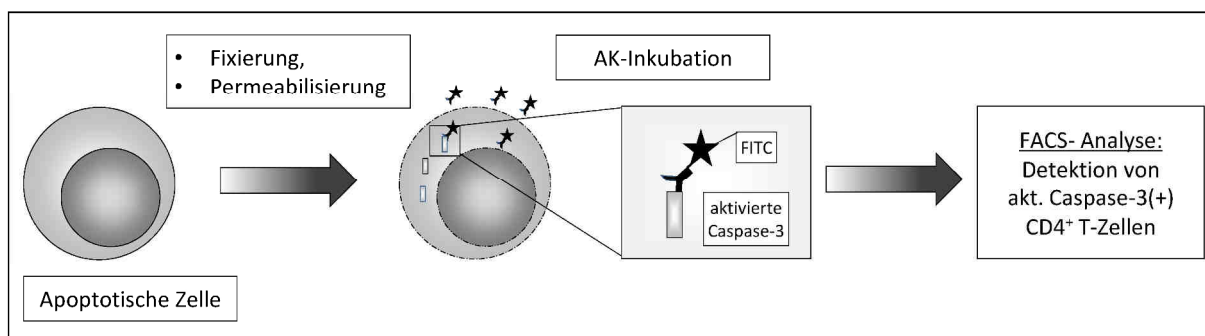
**Abb. 3.4: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des PARP-Assays.**

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgt die Inkubation eines spezifischen Fluorochromgekoppelten Antikörpers (AK) gegen das gesplante p85-Fragment von PARP. Im Anschluss werden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.9.3 Detektion aktivierter Caspase-3

Die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich alternativ auch über die Identifizierung aktivierte Caspase-3-positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmen. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Active Caspase-3 Apoptosis Kit verwendet. Caspase-3 gehört neben der Caspase-6 und Caspase-7 zur Gruppe der Effektor-Caspasen, welche im Rahmen der Apoptose aktiviert werden und zelleigene Proteine spalten sowie Nukleasen aktivieren, die in der Spätphase der Apoptose die Degradation der genomischen DNA bewirken. Die aktivierte Form der Caspase-3 entsteht aus der Spaltung der Pro-Caspase-3 durch vorgeschaltete Initiator-Caspasen.

Durchführung: 2x10<sup>5</sup> PBMC wurden mit jeweils 5 µl anti-CD3 und anti-CD8 gefärbt (15 min, RT) und nachfolgend mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 300 g, 5 min, 4°C). Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die gefärbten Zellen in 300 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung inkubiert (30 min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen zweimal in Perm/Wash-Lösung gewaschen (Zentrifugation: 500 g, 5 min, RT) und nachfolgend mit 5 µl eines Antikörpers gegen die aktivierte Caspase-3 (anti-activated Caspase-3) inkubiert (30 min, RT). Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch einen weiteren Waschschriff (Perm/Wash-Lösung; Zentrifugation: 500 g, 5 min, RT) wurden die Zellen in 200 µl CellFIX aufgenommen und durchflusszytometrische analysiert (Abbildung 3.5).



**Abb. 3.5: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des Caspase-3 Assays.**

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgt die Inkubation eines spezifischen Fluorochromgekoppelten Antikörpers (AK) gegen die aktivierte Form der Caspase-3. Im Anschluss werden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.10 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von Todesrezeptoren und ihrer Liganden**

In diesem Versuchsteil wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren Fas, DR4, DR5 und TNF- $\alpha$ -R1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde die relative Oberflächendichte der korrespondierenden Liganden FasL, TRAIL und TNF- $\alpha$  auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Für die durchflusszytometrische Analyse der Expression der einzelnen Oberflächenmarker wurde jeweils 100  $\mu$ l frisches heparinisiertes Vollblut von insgesamt 148 Patienten (HIV: n=78, HIV/HCV: n= 53, HCV: n=17) und 17 gesunden Probanden verwendet.

Als erster Schritt erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch die Mischung von Vollblut und FACS Lysing Solution im Verhältnis 1:10 (v/v) und anschließender Inkubation (10 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS (supplementiert mit 2,5 % (v/v) FCS; Zentrifugation: 500 g, 5 min, RT) wurden die Zellen mit je 5  $\mu$ l anti-CD3, anti-CD8 sowie mit 5  $\mu$ l eines Antikörpers gegen den jeweiligen Todesrezeptor bzw. Liganden inkubiert (30 min, 4°C). Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes Waschen (Zentrifugation: 500 g, 5 min, RT) entfernt und die Zellen anschließend in CellFIX fixiert. Zur Standardisierung der Messungen wurden die entsprechenden Isotyp-Kontrollen für die einzelnen Antikörper durchgeführt. Die Oberflächenexpression der einzelnen Proben wurde dann innerhalb von 2 h im Durchflusszytometer gemessen.

### **3.11 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

Der ELISA dient zum der Nachweis und Konzentrationsbestimmung von löslichen Antigenen über eine enzymatische Farbreaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von löslichem TRAIL, FasL und TNF- $\alpha$  von Patienten und gesunden Probanden verwendet. Hierfür wurden Serum-Proben von 104 Patienten (HIV: n=40, HIV/HCV: n= 49, HCV: n=15) und 20 gesunden Personen eingesetzt.

#### **3.11.1 Prinzip**

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten „Sandwich“-ELISA der Firma Diaclone erfolgt der Nachweis des löslichen Antigens über die Immobilisierung des Antigens auf einer beschichteten Mikrotiterplatte durch Bindung an einen spezifischen Antikörper gegen das Antigen (Primär-Antikörper). Im darauf folgenden Schritt erfolgt die Inkubation des immobilisierten Antigens mit einem weiteren spezifischen biotinylierten Antikörper. Der Biotinrest dieses Sekundär-Antikörpers dient zur Bindung des Enzyms Peroxidase, welches über ein Streptavidin-Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplexe („Sandwich“) bindet.



Die Zugabe des Enzymsubstrats TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) führt zu einer enzymatischen Reaktion, die in einem blauen Farbumschlag der Lösung resultiert. Der Zusatz von Schwefelsäure führt zu einem Stopp der Enzymreaktion und geht mit einem Farbumschlag von blau zu gelb einher. Anhand der Lichtabsorption der Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge (450 nm) kann der Antigengehalt der Probe quantitativ ausgewertet werden. Die Absorption korreliert hierbei direkt mit der Menge an gebundenem Protein. Durch den Vergleich der gemessenen Extinktion mit den Werten einer Verdünnungsreihe des Antigens in bekannter Konzentration (Standardreihe) kann so die Konzentration des Antigens in der Probe bestimmt werden.

### 3.11.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wird hier in Kürze beschrieben. Alle genannten Lösungen und Reagenzien sind Bestandteil der ELISA Kits.

**FasL ELISA:** Als ersten Schritt wurden eine Standardreihe (62,5 - 2000 pg/ml) sowie eine Positivkontrolle angesetzt und jeweils 100 µl in die Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte das Befüllen der restlichen Vertiefungen der Platte mit je 100 µl der Serum-Proben. Serum-Proben und Kontrollen wurden jeweils als Doppelansatz pipettiert. Nach zwei-stündiger Inkubation wurde die Platte dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und mit jeweils 50 µl des Sekundär-Antikörpers für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Platte abermals gewaschen und mit 100 µl einer Streptavidin-HRP (*engl. horseradish peroxidase*)-Lösung befüllt. Nach 30 min erfolgte die Zugabe des TMB-Substrats. Nach weiteren 15-20 min Inkubation im Dunkeln wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure gestoppt. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung der Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Das Detektionslimit liegt bei 12 pg/ml, der Variationskoeffizient beträgt 3,8 %.

**TRAIL ELISA:** Die Durchführung des TRAIL-ELISA gleicht dem des FasL-ELISA mit folgendem Unterschied: Die Zugabe des Sekundär-Antikörpers erfolgt direkt nach dem Pipettieren der Proben und Kontrollen, die Inkubation beträgt nur einmalig 3 Stunden. Die Standardreihe reicht von 93,75 – 3000 pg/ml. Das Detektionslimit liegt bei 64 pg/ml, der Variationskoeffizient betrug 6,2 %.

**TNF-α ELISA:** Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des FasL-ELISA. Die Standard-Reihe reichte von 25 – 800 pg/ml. Das Detektionslimit liegt bei 8 pg/ml, der Variationskoeffizient beträgt 3,3 %.

### 3.12 Statistische Methoden

Alle Werte und klinischen Parameter der einzelnen Patientengruppen wurden auf das Vorliegen einer Normalverteilung mit dem Kolmogorov–Smirnov Test (K-S Test) hin überprüft. Für die weiteren Analysen wurde bei zwei normal verteilten unabhängigen Stichproben ein t-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA (*engl. analysis of variance*) mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewandt. Die Daten wurden in diesem Fall als Mittelwert und Standardfehler (SEM) dargestellt.

Die Analyse von zwei nicht-normal verteilten unabhängigen Stichproben erfolgte unter der Verwendung des Mann-Whitney-Tests. Zur Korrektur für multiple Tests bei mehr als zwei Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. In beiden Fällen wurden die Daten als Median und 25 %/75 % Quantil angegeben und als Box Plots dargestellt.

Im Fall von gepaarten Stichproben wurde entweder eine gepaarte ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur (parametrisch) angewandt bzw. ein Friedman-Test mit anschließendem Dunn-Test bei nicht-parametrischen Stichproben.

Korrelationen zwischen Ergebnissen und klinischen Daten wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (parametrisch) bzw. der Rangkorrelation nach Spearman (nicht-parametrisch) analysiert. Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der Programme GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, La Jolla, USA) durchgeführt. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen ( $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

## 4 ERGEBNISSE

In den folgenden Abschnitten wird zuerst der Einfluss einer HCV-Koinfektion auf die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen betrachtet. Im Weiteren wird dann eine Beeinflussung der Apoptoserate von T-Helferzellen durch die HCV-Koinfektion beleuchtet sowie mögliche zugrunde liegende Mechanismen überprüft.

Potentielle Effekte der HCV-Koinfektion auf die genannten Parameter wurden durch den Vergleich von HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit nachweisbarer HIV-Last (HIV-RNA(+), virämisch) mit verschiedenen Kontrollgruppen untersucht. Hierzu zählen zum einen gesunde Probanden, zum anderen Patienten mit einer HIV-Monoinfektion mit positiver HIV-RNA und Patienten mit einer HCV-Monoinfektion.

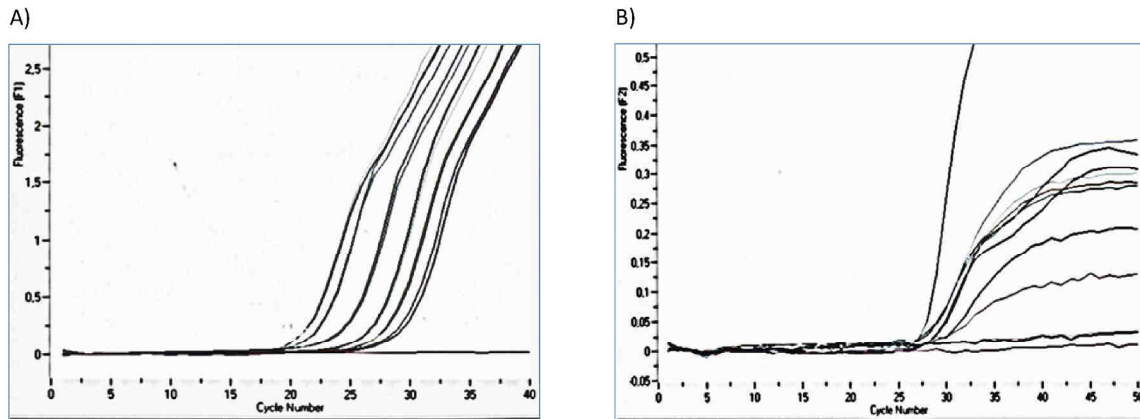
Etwaige Wechselwirkungen einer HCV-Koinfektion mit einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) wurden in einem zweiten Schritt untersucht, indem zusätzlich HIV-mono- und HIV/HCV-koinfizierte Patienten eingeschlossen wurden, die bereits effektiv mit einer antiretroviralen Kombinationstherapie behandelt wurden und keine nachweisbare HIV-Last (HIV-RNA(-), avirämisch) mehr aufwiesen.

### 4.1 CD4<sup>+</sup> T-Zell-Neubildungsrate

Als eine Kenngröße für die Neubildung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde in dieser Arbeit die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet, die kürzlich den Thymus verlassen haben (*engl. recent thymic emigrants, RTE*). Diese Zahl wurde dann im Verhältnis zu der im peripheren Blut vorhandenen T-Helferzellen gesetzt und diente damit als Maß für die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Anzahl der RTE wurde durch den Nachweis von sjTRECs (*engl. T cell receptor excision circles*) und der Quantifizierung von CCR5-Genkopien mittels quantitativer Echtzeit-PCR ermittelt (siehe Punkt 3.5, Seite 27). Insgesamt standen DNA-Proben isolierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 157 Patienten und Probanden zur Verfügung. Von diesen konnten bei 105 Proben TRECs nachgewiesen werden. Bei 52 Ansätzen konnten die Fluoreszenzsignale nicht ausgewertet werden. In diesen Proben befand sich nur eine geringe Anzahl von sjTRECs. Durch die PCR konnten die in der Probe vorhandenen TRECs nicht mehr ausreichend amplifiziert werden, um ein auswertbares Fluoreszenzsignale zu erzeugen. Die Nachweisgrenze lag dabei bei etwa 100 sjTRECs pro DNA-Probe. Eine Assoziation der nicht-auswertbaren Proben mit einzelnen Patientengruppen wurde nicht gefunden. In jeder Patientengruppe konnten ca. 30 – 35 % der Proben nicht ausgewertet werden. Es zeigte sich jedoch, dass TRECs vor allem in den Proben nicht nachgewiesen werden konnten, in denen der DNA-Gehalt

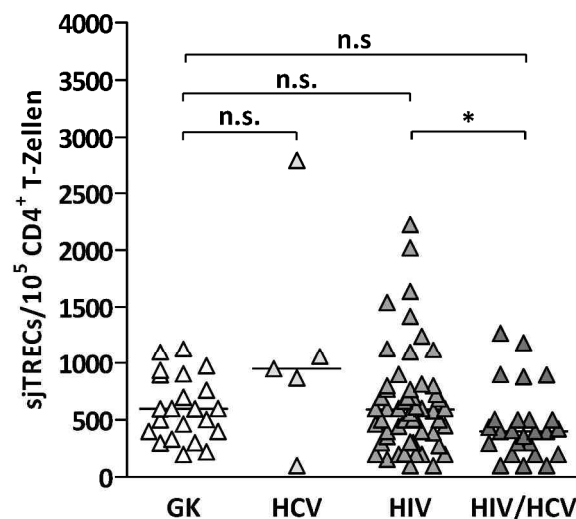
gering war (Proben mit hohem Ct-Wert der CCR5-Genkopien). Abbildung 4.1 zeigt beispielhaft die quantitative Messung von CCR5-Genkopien und sjTRECs in DNA-Proben verschiedener Probanden und Patienten.



**Abb. 4.1: Amplifikation von CCR5-Genkopien und sjTRECs mittels Echtzeit-PCR.**

Die Grafik zeigt beispielhaft die Amplifikation des CCR5-Gens (A) und von sjTREC (B) in DNA-Proben von verschiedenen Patienten. Auf der Ordinate ist die relative Fluoreszenz verzeichnet, auf der Abszisse die Anzahl der PCR-Zyklen.

Wie in Abbildung 4.2 verdeutlicht, sind die RTE-Werte einer starken Streuung unterworfen. Dies ist vor allem bei der HIV- und der HCV-monoinfizierten Patientengruppe der Fall. Allerdings war zu beachten, dass die Fallzahl auswertbarer Proben bei der HCV-monoinfizierten Patientengruppe mit 5 Proben sehr gering war.



**Abb. 4.2: sjTREC-Konzentrationen von  $CD4^+$  T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen.**

Als Maß für die Neubildungsrate von  $CD4^+$  T-Zellen wird das Verhältnis zwischen RTE (*engl. recent thymic emigrants*) und  $CD4^+$  T-Zellzahl verwendet. Abb. 4.2 gibt die RTE als TRECs pro  $10^5$   $CD4^+$  T-Zellen wieder. Die TREC-Konzentrationen von gesunden Probanden und verschiedenen Patienten (GK: n=22, HCV: n=5, HIV: n=54, HIV/HCV: n= 26) sind dargestellt als Dotplot und Median (Balken). Für die statistische Analyse wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt.

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der TREC-Konzentration bei HIV-monoinfizierten Patienten gefunden werden. Dagegen wiesen Patienten mit einer HCV-Monoinfektion im Median höhere RTE-Werte auf. Der statistische Vergleich der Gruppe ergab aufgrund der geringen Fallzahl jedoch keinen signifikanten Unterschied. Die geringsten RTE-Werte konnten jedoch bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion beobachtet werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden sowie Patienten mit einer HIV- oder HCV-Monoinfektion waren die RTE-Werte im Median erniedrigt (Tabelle 4.1). Jedoch nur im Vergleich mit HIV-monoinfizierten Patienten erreichten die Unterschiede statistische Signifikanz ( $p = 0,039$ ).

**Tab. 4.1: sjTREC-Konzentrationen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	sjTRECs/10 <sup>5</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <sup>a)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	22	596 (365/900)	
HCV-Monoinfiziert	5	949 (483/1930)	n.s. vs. GK
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	54	590 (330/785)	n.s. vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	26	400 (247/503)	$p = 0,039$ vs. HIV, n.s. vs. GK

<sup>a)</sup> Median (25 %/75 % Interquartil)

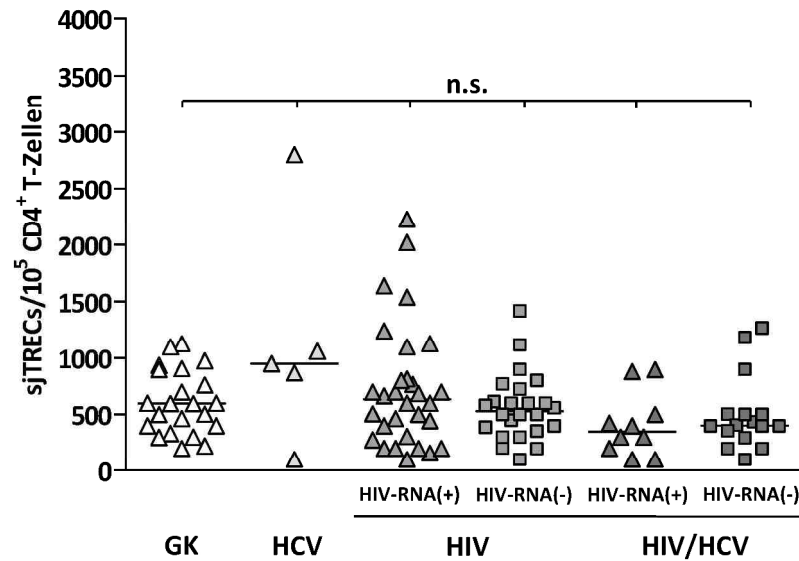
Die Stratifizierung HIV-positiver Patienten in Individuen mit und ohne HIV-Virämie offenbarte kaum Unterschiede in den TREC-Konzentrationen zwischen Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA und nicht-nachweisbarer HIV-Last, weder bei HIV-monoinfizierten, noch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten (Abbildung 4.3).

Die Neubildungsrate bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-RNA war jedoch geringfügig höher als bei virämischen Patienten, im Gegensatz zu den HIV-monoinfizierten Patientengruppen. Im Median waren die RTE-Werte bei den avirämischen Patienten mit HIV-Monoinfektion etwas geringer. Die Unterschiede erreichten jedoch ebenfalls nicht das statistische Signifikanzniveau von 5 %. Auch zwischen den avirämischen Patientengruppen konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug zur CD4<sup>+</sup> T-Zell-Neubildungsrate gefunden werden. Tabelle 4.2 fasst die einzelnen Werte noch einmal zusammen.

**Tab. 4.2: sjTREC-Konzentrationen bei virämischen und avirämischen HIV(+) Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	sjTRECs/10 <sup>5</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <sup>a)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	22	596 (365/900)	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	30	633 (290/957)	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	24	530 (371/1418)	n.s.
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	10	350 (150/689)	
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	19	436 (357/1184)	

<sup>a)</sup> Median (25 %/75 % Interquartil)



**Abb. 4.3: TREC-Konzentrationen von virämischen und avirämischen HIV(+)-Patienten.**

Die Abbildung stellt die einzelnen sjTREC-Konzentrationen von  $CD4^+$  T-Zellen verschiedener Patientengruppen als Dotplot und Median (Balken) dar. Die HIV(+) Patienten wurden in virämische (HIV - HIV-RNA(+):  $n=30$ , HIV/HCV - HIV-RNA(+):  $n=10$ ) und nicht virämische unterteilt (HIV - HIV-RNA(-):  $n=24$ , HIV/HCV - HIV-RNA(-):  $n=16$ ) und den gesunden Kontrollen gegenübergestellt (GK:  $n=22$ ). Für die statistische Analyse wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Ein  $p$ -Wert  $> 0,05$  gilt als nicht signifikant (n.s.).

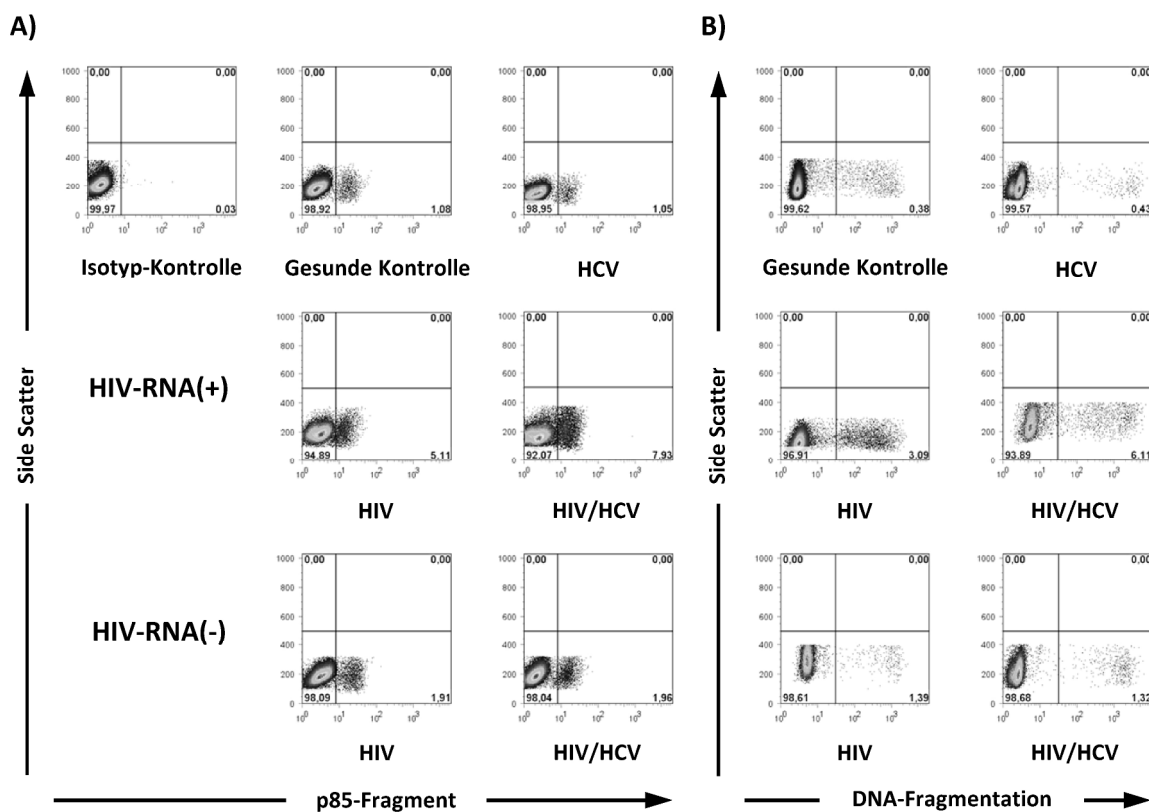
In einem nächsten Schritt wurden mögliche Assoziationen der Neubildungsrate von T-Helferzellen mit klinischen und demographischen Parametern überprüft. Obwohl das Alter nachweislich eine Rolle bei der Produktion von Thymozyten spielt und diese im Verlauf des Lebens abnimmt, konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der  $CD4^+$  T-Zell-Neubildungsrate bei gesunden Probanden festgestellt werden. Die Alters-Verteilung der gesunden Kontrollgruppe lag jedoch in einem Bereich (im Mittel 31 Jahre), in dem die Thymozytenproduktion nur noch langsam abnimmt. Auch die Differenzen im Durchschnittsalter zwischen den einzelnen Patientengruppen waren nur marginal und hatten demnach keinen Einfluss auf die beobachteten Unterschiede in der Neubildungsrate. Das Geschlecht war ebenfalls nicht mit der Neubildungsrate von T-Helferzellen assoziiert.

Darüber hinaus wurden Parameter des HIV-Status wie  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellzahl in Bezug zur Produktion von  $CD4^+$  T-Zellen untersucht. Auch hier konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden. Trotzdem wurden alle Patienten, deren RTE-Werten stark vom Median abwichen, noch einmal gesondert betrachtet: Hierzu wurden die sieben höchsten bzw. zwei höchsten Werte aus den virämischen und avirämischen Patientengruppen mit HIV-Monoinfektion ausgewählt, sowie die zwei bzw. drei höchsten Werte aus den Patientengruppen mit HIV/HCV-Koinfektion. Jedoch konnte bei diesen Patienten kein signifikanter Zusammenhang zwischen Neubildungsrate und klinischen Daten hergestellt werden. Auch eine erhöhte  $CD4^+$  T-Zell-Apoptoserate konnte im Vergleich zu den restlichen Individuen der jeweiligen Patientengruppe nicht nachgewiesen werden.

## 4.2 Untersuchungen zum Einfluss der HCV-Koinfektion auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose

### 4.2.1 Ex vivo CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA

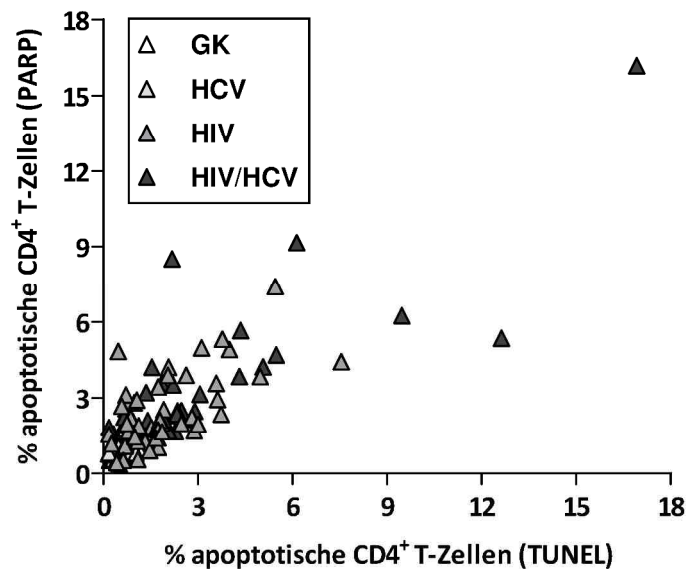
Für die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose wurden mit dem PARP- und dem TUNEL-Assay zwei Methoden verwendet, welche Zellen in verschiedenen Phasen der Apoptose nachweisen (Abbildung 4.4). Der PARP-Assay weist in apoptotischen Zellen das p85-Fragment nach, welches durch die Spaltung von PARP durch die aktivierte Caspase-3 entsteht. Dagegen detektiert der TUNEL-Assay Zellen mit einem hohen Grad der DNA-Fragmentierung, welcher charakteristisch ist für spät-apoptotische Zellen.



**Abb. 4.4: Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplots von Personen aus jeder Patientengruppe, bei denen apoptotische Zellen mittels PARP- (Spalten 2, 3) bzw. TUNEL-Assay (Spalten 4, 5) detektiert wurden. Der Dotplot der Isotyp-Kontrolle ist repräsentativ für alle Kontrollen, die für jeden Patienten bestimmt wurden (Spalte 1). Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert. Apoptotische CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind definiert als PARP-positiv und befinden sich im unteren rechten Quadranten. Spät-apoptotische CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeichnen sich durch einen hohen Grad der DNA-Fragmentierung (TUNEL) aus und erscheinen im unteren rechten Quadranten.

Beide Assays zeigten beim Vergleich der verschiedenen Patientengruppen konsistent ähnliche Muster bei der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate. Abbildung 4.5 veranschaulicht deutlich, dass die gemessenen Apoptoseraten der T-Helferzellen der beiden Assays unabhängig von einer zugrundeliegenden HIV- oder HCV-Infektion signifikant miteinander korrelierten.



**Abb. 4.5: Assoziation zweier Apoptose-Assays bzgl. der gemessenen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate.**

Die Abbildung zeigt die durch den PARP- und TUNEL-Assay ermittelte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von allen eingeschlossenen Patienten (HIV: n=47, dunkelgraue Dreiecke; HCV: n=10, hellgraue Dreiecke; HIV/HCV: n=39, schwarze Dreiecke) und gesunden Kontrollen (n=12, offene Dreiecke). Auf der Ordinate sind die Ergebnisse des PARP-Assays, auf der Abszisse die Ergebnisse des TUNEL-Assays aufgetragen. Die Ergebnisse der beiden Assays sind, unabhängig von einer zugrundeliegenden HIV- oder HCV-Infektion, signifikant miteinander assoziiert ( $R^2 = 0,61$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Für die statistische Analyse wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson verwendet.

Wie in Tabelle 4.3 aufgezeigt, war der Anteil der spät-apoptotischen Zellen, nachgewiesen durch den TUNEL-Assay, im Mittel geringer als beim PARP-Assay. Diese Beobachtung sowie die signifikante Korrelation der beiden Assays sprechen dafür, dass spezifisch spontane Apoptose in T-Helferzellen nachgewiesen wurde.

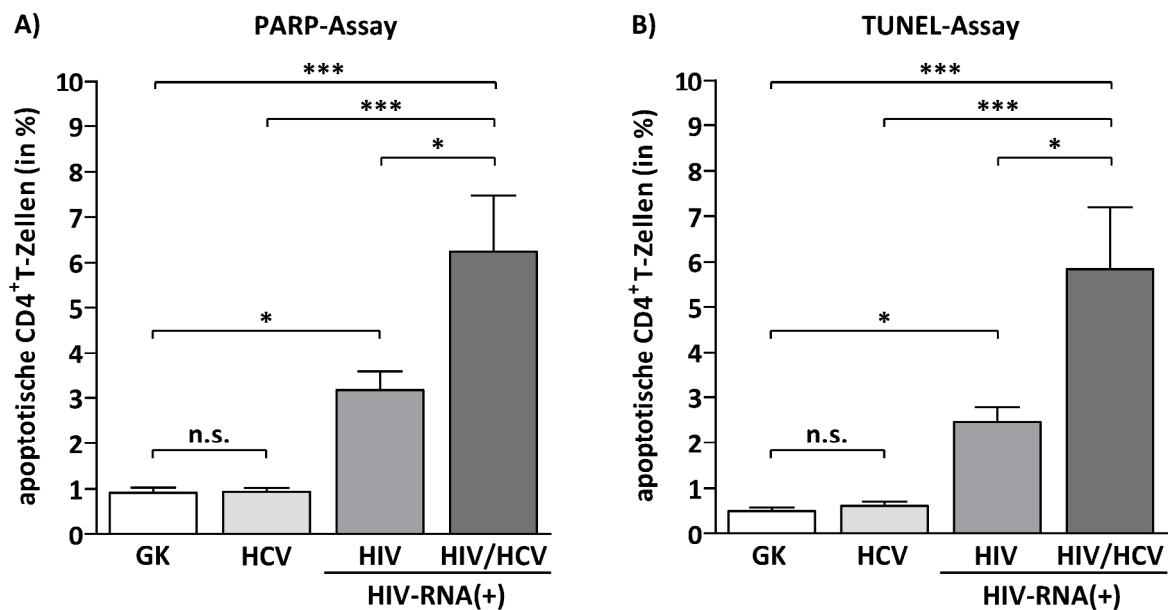
**Tab. 4.3: Mittlere CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate verschiedener Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate (in %) <sup>a)</sup>	
		PARP-Assay	TUNEL-Assay
Gesunde Kontrollen (GK)	12	0,91±0,11	0,50±0,08
HCV-Monoinfiziert	10	0,94±0,08	0,62±0,09
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	25	3,17±0,41	2,46±0,32
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	16	6,24±1,22	5,82±1,36

<sup>a)</sup> Mittelwert ± SEM



Die Ergebnisse der beiden Apoptose-Assays, dargestellt in Abbildung 4.6, zeigten deutliche Unterschiede bei der Apoptoserate zwischen den einzelnen Patientengruppen: Während gesunde Probanden und HCV-monoinfizierte Patienten fast identische Apoptoseraten aufwiesen, war der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-monoinfizierten Patienten mit einer nachweisbaren HIV-Last im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ).



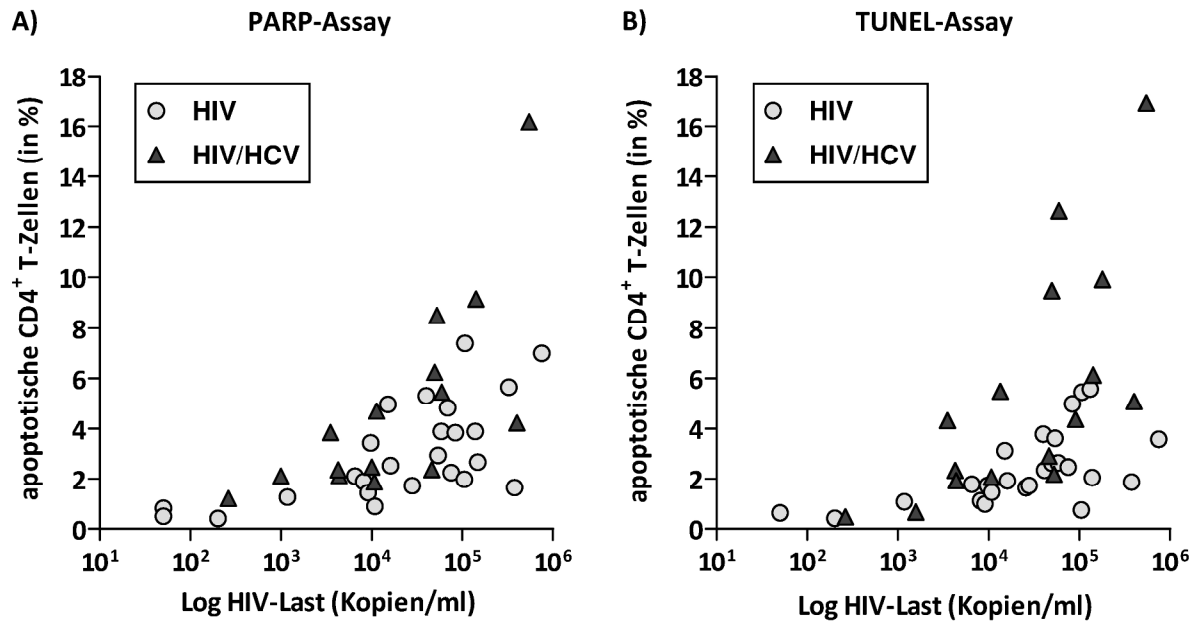
**Abb. 4.6: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate verschiedener Patientengruppen.**

Abb. 4.6A zeigt die Ergebnisse des PARP-Assays. Abb. 4.6B stellt die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Bestimmung der DNA Fragmentierung (TUNEL-Assay) dar. Die einzelnen Säulen geben den Mittelwert und den Standardfehler (SEM) der Apoptoserate von gesunden Kontrollen (GK) (n=12), HCV-Monoinfizierten (n=10), HIV-Monoinfizierten (n=25) sowie HIV/HCV-Koinfizierten (n=14) an. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Interessanterweise war die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion gegenüber Patienten mit einer HIV- und HCV-Monoinfektion nochmals signifikant gesteigert. Im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion war der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen näherungsweise doppelt so hoch ( $p \leq 0,05$ ).

Um mögliche Abhängigkeiten zwischen der erhöhten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose und dem klinischen Verlauf der HIV-positiven Patienten aufzudecken, wurde die Apoptoserate mit verschiedenen demografischen und klinischen Parametern korreliert.

Dabei zeigte sich, dass die Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant mit der HIV-Last HIV-infizierter Patienten korreliert (Abbildung 4.7). Dieser Zusammenhang galt nicht nur für Patienten mit einer HIV-Monoinfektion, sondern auch für Patienten, die mit dem Hepatitis C-Virus koinfiziert waren. Interessanterweise wurden die Unterschiede in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate zwischen HIV-Monoinfizierten und HIV/HCV-Koinfizierten mit zunehmender HIV-Last größer.



**Abb. 4.7: Assoziation zwischen HIV-Last und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose.**

Die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose von HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten (Ordinate) ist gegen die HIV-Last (Abszisse) aufgetragen. (A) Die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate, die mit dem PARP-Assay ermittelt wurde, korreliert signifikant mit der HIV-Last in den Patientengruppen mit HIV-Monoinfektion und HIV/HCV-Koinfektion (HIV:  $r_s = 0,66$ ,  $p = 0,0003$ ; HIV/HCV:  $r_s = 0,82$ ,  $p = 0,0002$ ). (B) Die anhand der DNA-Fragmentierung (TUNEL-Assay) ermittelte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate korreliert ebenfalls mit HIV-Last (HIV:  $r_s = 0,66$ ,  $p = 0,0003$ ; HIV/HCV:  $r_s = 0,79$ ,  $p = 0,0003$ ). Für die statistische Analyse wurde eine Rangkorrelation nach Spearman angewandt.

Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Assoziation zwischen der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose und der HCV-Last gefunden werden, weder bei Patienten mit einer HCV-Monoinfektion noch bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion. Auch weitere Parameter einer HCV-Infektion wie der HCV-Genotyp oder Leber-Enzym-Werte (ALT, AST,  $\gamma$ -GT) waren nicht mit der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate assoziiert.

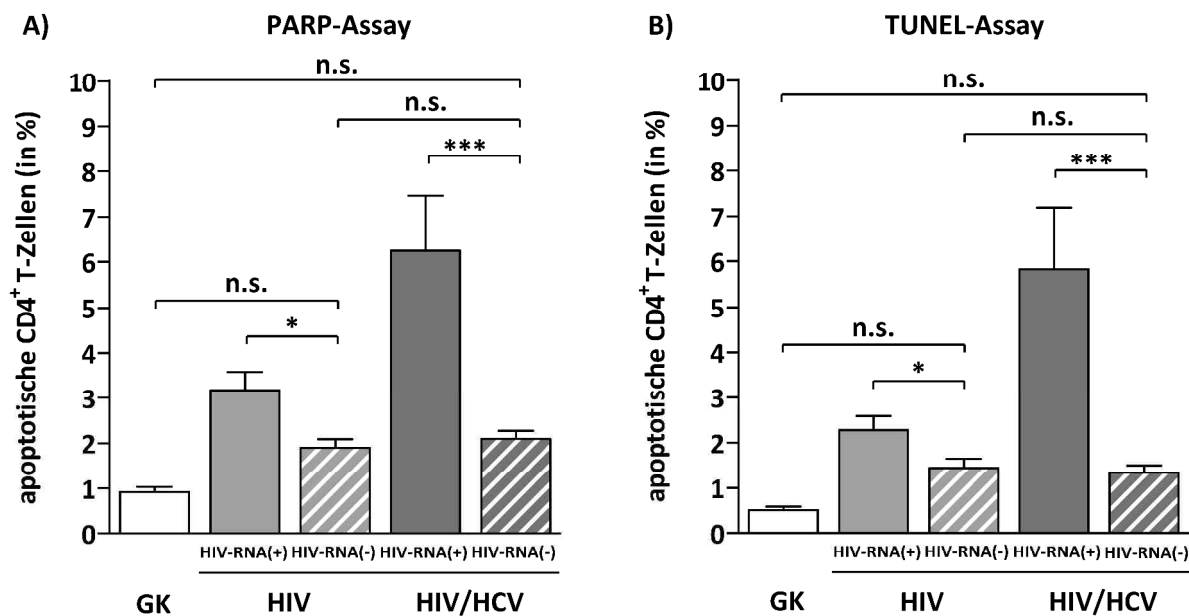
#### 4.2.2 Ex vivo CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV-RNA(-) Patienten

Im ersten Teil unserer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine HIV/HCV-Koinfektion bei HIV-RNA positiven Patienten im Vergleich zur HIV-Monoinfektion mit einer signifikant erhöhten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose assoziiert war.

Eine effektive antiretrovirale Therapie (cART, HAART) ist dagegen in der Lage viele immunologische Anomalien, die in unbehandelten HIV-Patienten beobachtet worden sind, umzukehren. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwieweit sich die effektive Inhibition der HIV-Replikation im Zuge einer HAART auf CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV-positiven Individuen auswirkt. Von weiterem Interesse war es zudem zu erforschen, ob eine Koinfektion mit HCV Auswirkungen auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei Patienten mit einer HIV-Infektion hat, die

mit einer effektiven HAART behandelt worden sind. Hierzu wurde in einer Querschnittsuntersuchung die *ex vivo* Apoptoserate bei HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten bestimmt, bei denen im Zuge der HAART konsistent ein Jahr keine HIV-Last (avirämisch) nachgewiesen wurde.

Wie in Tabelle 4.4 und in Abbildung 4.8 dargestellt, war eine effektive HAART mit einer signifikant verringerten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate assoziiert. Der Anteil apoptotischer T-Helferzellen von avirämischen HIV-monoinfizierten Patienten nahm im Vergleich zu Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA signifikant ab ( $p \leq 0,05$ ). Auch bei der Gegenüberstellung der beiden HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppen zeigte sich eine signifikante Verringerung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose ( $p \leq 0,001$ ). Im Vergleich zur HIV-Monoinfektion war die Reduktion der Apoptoserate dabei absolut wie auch prozentual größer.



**Abb. 4.8: Einfluss der HAART auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose.**

Dargestellt ist der Prozentsatz apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit (HIV: n=22, HIV/HCV: n=23) bzw. ohne einer effektiven HAART (HIV: n=25, HIV/HCV: n=16). Abb. 4.8A bezieht sich auf die Ergebnisse des PARP-Assays, Abb. 4.8B auf die des TUNEL-Assays. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Daraus ergab sich, dass unter HAART, im Gegensatz zu den Patientengruppen mit nachweisbarer HIV-RNA, zwischen HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten kein signifikanter Unterschied in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose mehr festgestellt werden konnte. Dennoch verblieb die mittlere Apoptoserate der T-Helferzellen bei beiden avirämischen Patientengruppen höher als die der gesunden Kontrollgruppe. Der Unterschied erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz.

Tab. 4.4: Vergleich der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei HIV-positiven Patientengruppen

	Gesunde	HIV-Monoinfektion			HIV/HCV-Koinfektion		
	Kontrolle	HIV-RNA(+)	HIV-RNA(-)	Änderung	HIV-RNA(+)	HIV-RNA(-)	Änderung
PARP-Assay <sup>a)</sup>	0,91±0,1	3,17±0,41	1,90±0,19	- 40 %	6,24±1,22	2,10±0,18	- 66 %
TUNEL-Assay <sup>a)</sup>	0,50±0,1	2,46±0,32	1,44±0,21	- 41 %	5,82±1,36	1,34±0,16	- 77 %

<sup>a)</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate, Mittelwert ± SEM

Als mögliche Ursache für die residuale Apoptose bei Patienten ohne nachweisbare HIV-Virämie wurden neben der anhaltenden chronischen HIV-Infektion, auch HAART-abhängige Mechanismen in Betracht gezogen. Aufgrund dessen erfolgte die Stratifizierung von avirämischen Patienten nach der Zusammensetzung der HIV-Therapie. Grundsätzlich ließen sich in diesem Fall zwei Therapieformen unterscheiden: Zum einen eine Kombination, die einen Protease-Inhibitor enthält (PI-basiert), zum anderen eine nicht PI-basierte Therapie, die eine Kombination von verschiedenen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI, NNRTI) enthält (siehe Tabelle 2.2, Seite 24).

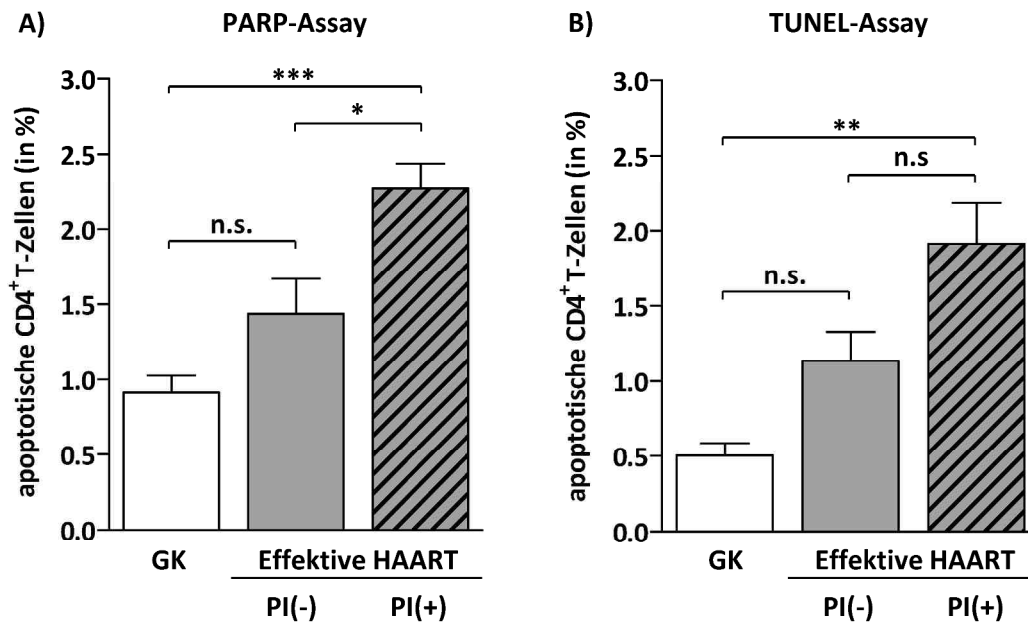
Die Unterteilung der Therapieformen zeigte, dass die Verwendung eines Protease-Inhibitors mit einer signifikant höheren CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate verbunden war. Wie in Tabelle 4.5 und in Abbildung 4.9 veranschaulicht, war der Anteil apoptotischer T-Helferzellen bei Patienten, die einen Protease-Inhibitor einnahmen signifikant höher als bei gesunden Kontrollen.

Tab. 4.5: Vergleich der mittleren CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV-RNA(-) Patientengruppen

	Gesunde	HIV-RNA(-) Patienten		p-Werte
	Kontrollen (GK)	PI (-)	PI (+)	
PARP-Assay <sup>a)</sup>	0,91±0,11	1,44±0,23	2,27±0,17	PI(+) vs. PI(-): $p \leq 0,05$ PI(+) vs. GK: $p \leq 0,001$
TUNEL-Assay <sup>a)</sup>	0,50±0,08	1,14±0,19	1,91±0,27	PI(+) vs. GK: $p \leq 0,01$

<sup>a)</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate, Mittelwert ± SEM

Auch im Vergleich mit der Patientengruppe, bei der ausschließlich Reverse Transkriptase-Inhibitoren eingesetzt wurden, war der Prozentsatz apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich höher. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde hier allerdings nur bei den Ergebnissen des PARP-Assays erreicht. Weiterhin erwähnenswert ist, dass die Differenzen der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose zwischen PI und nicht PI-basierten Medikamenten-Kombinationen unabhängig davon waren, ob die Patienten HIV/HCV-koinfiziert waren.



**Abb. 4.9: Einfluss von Protease-Inhibitoren auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose.**

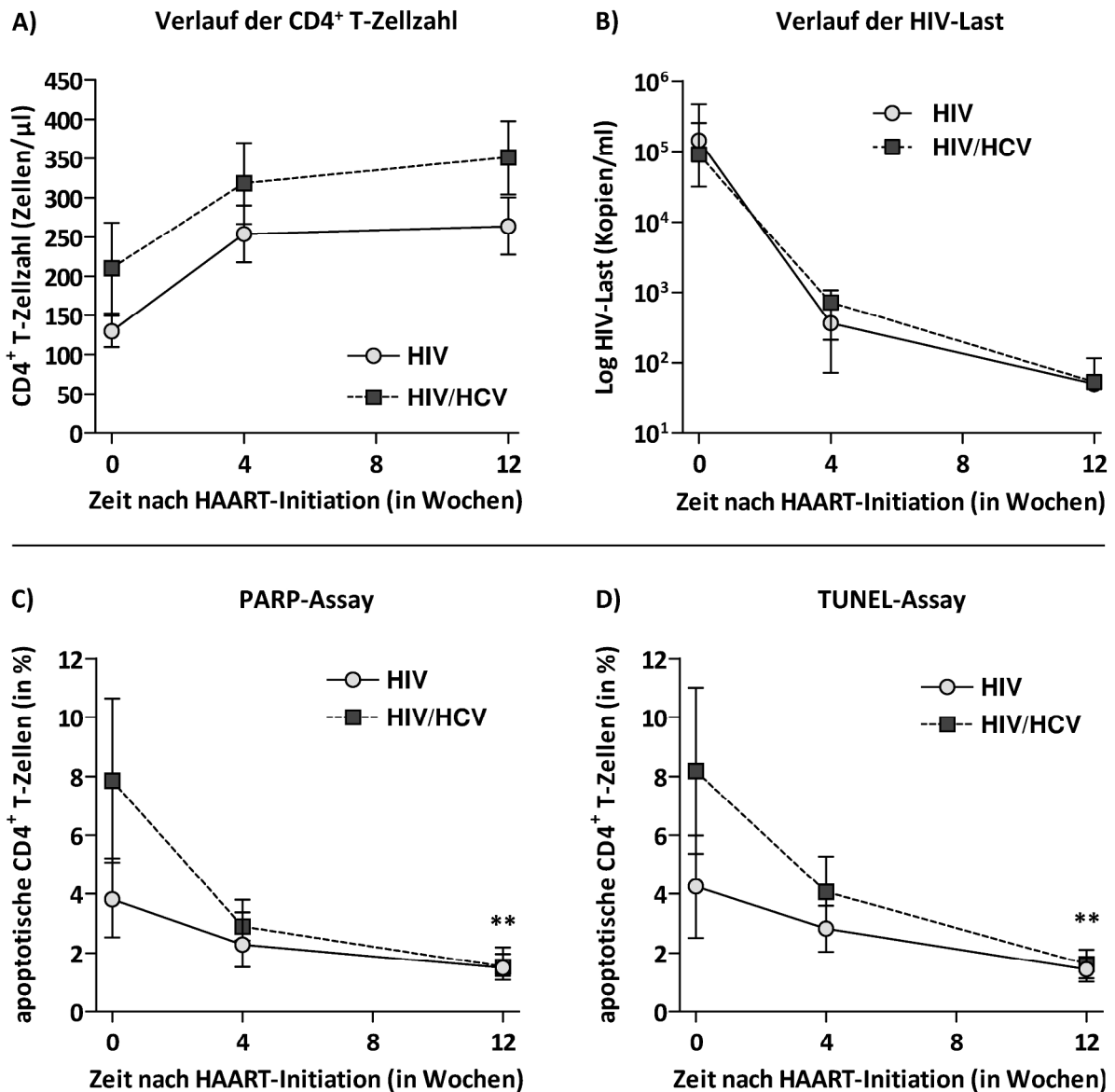
Dargestellt ist der Prozentsatz apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit dem PARP-Assay (A) bzw. dem TUNEL-Assay (B) ermittelt wurden. Alle untersuchten Patienten (HIV: n=22, HIV/HCV: n=23) wurden in Bezug auf die Zusammensetzung der HAART unterteilt, unabhängig von einer eventuellen HCV-Koinfektion. 31 Patienten wurden mit einem Protease-Inhibitor (PI[+]) behandelt, bei 14 Patienten enthielt die HAART eine Kombination von verschiedenen reverse Transkriptase-Inhibitoren (PI[-]). Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Neben der Querschnittsuntersuchung war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose im Verlauf der Immunrekonstitution zu beobachten sowie einen möglichen Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Veränderungen festzustellen. Hierzu wurde bei unbehandelten HIV-mono- und HIV/HCV-koinfizierten Patienten der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Beginn, sowie 4 und 12 Wochen nach Einleitung einer erstmaligen HAART bestimmt.

Die longitudinale Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate offenbarte eine signifikante Abnahme apoptotischer T-Helferzellen in beiden Patientengruppen nach Einleitung einer antiretroviralen Therapie. Die Abbildungen 4.10C und 4.10D lassen dies deutlich erkennen. Die mittlere CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von HIV/HCV-koinfizierten Patienten war zu Beginn der antiretroviralen Therapie höher als die HIV-monoinfizierter Patienten. Im Verlauf der ersten 4 Wochen nach Beginn der HAART war die Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit HIV/HCV-Koinfektion merklich stärker als bei der HIV-monoinfizierten Patientengruppe.

Dagegen zeigten sich im Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen in Bezug zum Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl (Abbildung 4.10A). Zwar erhöhte sich die Zahl der T-Helferzellen in den ersten vier Wochen nach Einleitung der HAART bei HIV-Monoinfizierten um 125 Zellen/ $\mu$ l, während sie bei HIV/HCV-Koinfizierten im Mittel nur um 108

Zellen/ $\mu\text{l}$  zunahm (Tabelle 4.6). In den folgenden 8 Wochen stieg die  $\text{CD4}^+$  T-Zellzahl nur noch um 10 (HIV) bzw. 31 (HIV/HCV) Zellen/ $\mu\text{l}$ . Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 Wochen betrachtet, war die Differenz der Zunahme zwischen beiden Gruppen mit 6  $\text{CD4}^+$  T-Zellen/ $\mu\text{l}$  jedoch weitgehend vernachlässigbar. Die Ergebnisse lassen bei beiden Patientengruppen einen biphasischen Anstieg der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen erkennen, der zu Beginn der Immunrekonstitution im Rahmen der HAART stärker war als in den nachfolgenden Wochen.



**Abb. 4.10: Veränderungen der  $\text{CD4}^+$  T-Zell-Apoptose im Verlauf der Immunrekonstitution.**

Die Graphen A-D zeigen die  $\text{CD4}^+$  T-Zellzahl (A), HIV-Last (B) und die  $\text{CD4}^+$  T-Zell-Apoptoserate (C: PARP-Assay, D: TUNEL-Assay) von HIV-Monoinfizierten ( $n=8$ , grau ausgefüllte Kreise) und HIV/HCV-Koinfizierten ( $n=5$ , schwarze Quadrate) nach Einleitung einer HAART. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler zu Beginn, sowie 4 und 12 Wochen nach HAART-Initiation. Für die statistische Analyse wurde der gepaarte, nicht-parametrische Friedman-Test mit anschließendem Dunn-Test verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Tab. 4.6: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose und HIV-Status bei HIV-Patienten im Verlauf einer HAART

	HIV-Monoinfektion			HIV/HCV-Koinfektion		
	Woche 0	Woche 4	Woche 12	Woche 0	Woche 4	Woche 12
CD4 <sup>+</sup> T-Zellzahl (Zellen/ $\mu$ l) <sup>a)</sup>	129 $\pm$ 20	254 $\pm$ 36	264 $\pm$ 36	210 $\pm$ 58	318 $\pm$ 51	351 $\pm$ 147
Log <sub>10</sub> HIV-Last (Kopien/ml) <sup>a)</sup>	5,23 $\pm$ 4,6	2,77 $\pm$ 2,4	1,73 $\pm$ 0,5	5,34 $\pm$ 5,0	2,82 $\pm$ 2,3	1,89 $\pm$ 1,4
PARP-Assay (in %) <sup>b)</sup>	3,84 $\pm$ 0,5	2,62 $\pm$ 0,4	1,71 $\pm$ 0,2	7,86 $\pm$ 2,8	2,90 $\pm$ 0,47	1,53 $\pm$ 0,4
TUNEL-Assay (in %) <sup>b)</sup>	4,14 $\pm$ 1,7	2,82 $\pm$ ,8	1,44 $\pm$ 0,4	8,18 $\pm$ 2,8	4,06 $\pm$ 1,2	1,62 $\pm$ 0,5

<sup>a)</sup> Median  $\pm$  SEM <sup>b)</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate, Mittelwert  $\pm$  SEM

Eine Zweiphasigkeit im Verlauf zeigte sich ebenfalls in Bezug zur Inhibition der HIV-Replikation, dargestellt in Abbildung 4.10B. Innerhalb der ersten 4 Wochen sank die mittlere HIV-Last bei beiden Patientengruppen um jeweils ca. 2,5 log<sub>10</sub>-Stufen ab. Nach weiteren 8 Wochen verringerte sich die HIV-Last nur noch um ca. eine log<sub>10</sub>-Stufe. Nach insgesamt 12 Wochen antiretroviraler Behandlung nahm die HIV-Last im Vergleich zur Woche 0 bei HIV-mono- und HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Mittel um insgesamt ca. 3,5 log<sub>10</sub>-Stufen ab und näherte sich damit der Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml.

Vergleichbar mit der Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl und der Reduktion der HIV-Last ließen sich 12 Wochen nach HAART-Initiation keine erkennbaren Unterschiede zwischen der HIV-monoinfizierten und der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe in Bezug zur CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose mehr beobachten. Die mittlere Apoptoserate der T-Helferzellen von beiden Patientengruppen sank im Vergleich zu Beginn der HAART signifikant. Sie lag damit im gleichen Prozentbereich wie sie für die HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten avirämischen Patientengruppen gemessen wurden, die bereits mindestens ein Jahr mit einer effektiven antiretroviralen Therapie behandelt worden waren (vergleiche Tab. 4.4, Seite 48 mit Tab. 4.6, Seite 51). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass sich die Verringerung der Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie sie bei Patienten ohne nachweisbare HIV-Last im Vergleich zu virämischen Patienten beobachtet worden war, bereits in den ersten Wochen nach Initiation der HAART erfolgt und nicht linear verläuft.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine effektive antiretrovirale Behandlung mit einer signifikanten Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose assoziiert war. Es zeigte sich, dass die höhere Apoptoserate bei der HCV-Koinfektion, die in virämischen Patienten beobachtet wurde, nach der HAART nicht mehr bestand. Des Weiteren verlief die Reduktion apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei beiden Patientengruppen in zwei Phasen und damit in Übereinstimmung mit der Entwicklung der Immunrestitution und der Inhibition der HIV-Replikation.

Einen positiven Effekt der antiretroviralen Therapie auf den HCV-Status ließ sich dagegen nicht beobachten. Im Vergleich zu unbehandelten Patienten war bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten unter HAART die HCV-Last nur geringfügig verringert (siehe Tab. 2.1, Seite 23). Dagegen waren die Werte der Leber-Enzyme (ALT, AST,  $\gamma$ -GT) im Mittel leicht erhöht.

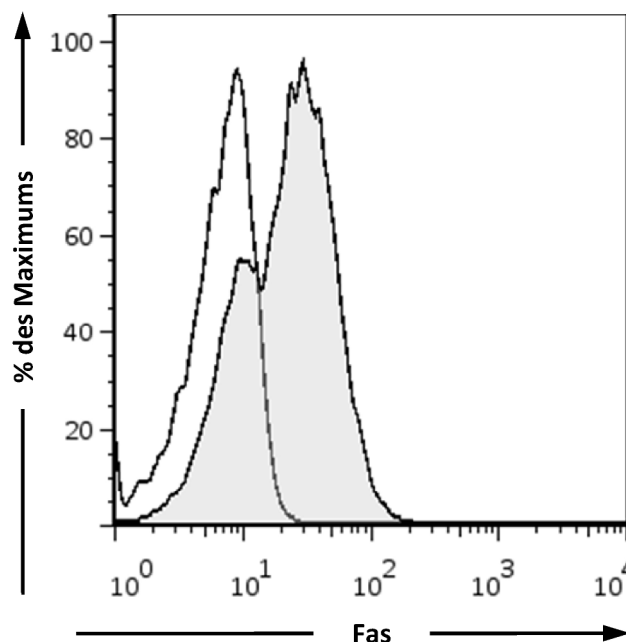
### 4.3 Expression und Funktion von Todesrezeptoren und ihren Liganden

Der extrinsische Weg ist einer der zentralen Mechanismen, die zur Apoptose von Zellen führt. Die Initiation der Apoptose über diesen Weg erfolgt über die Bindung von Todesliganden an die korrespondierenden Rezeptoren auf den Zielzellen. Analog zur Untersuchung der *ex vivo* Apoptoserate bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde daraufhin die Expression und die Funktion der Todesrezeptoren (Fas, DR4, DR5, TNF- $\alpha$ -R1) und deren Liganden (FasL, TRAIL, TNF- $\alpha$ ) in einer Querschnittsuntersuchung näher bestimmt. Die Ergebnisse wurden dann daraufhin geprüft, in wieweit mögliche Veränderungen einzelner Liganden-Rezeptor-Signalwege als Erklärung für die erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion dienen könnten.

#### 4.3.1 Fas-Ligand und Fas-Rezeptor

##### 4.3.1.1 Oberflächenexpression des Fas-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Oberflächendichte des Fas-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Inkubation mit einem Antikörper bestimmt, der spezifisch Fas auf der Oberfläche der Zellen erkennt. Abbildung 4.11 veranschaulicht beispielhaft, die Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu einer Isotyp-Kontrolle.

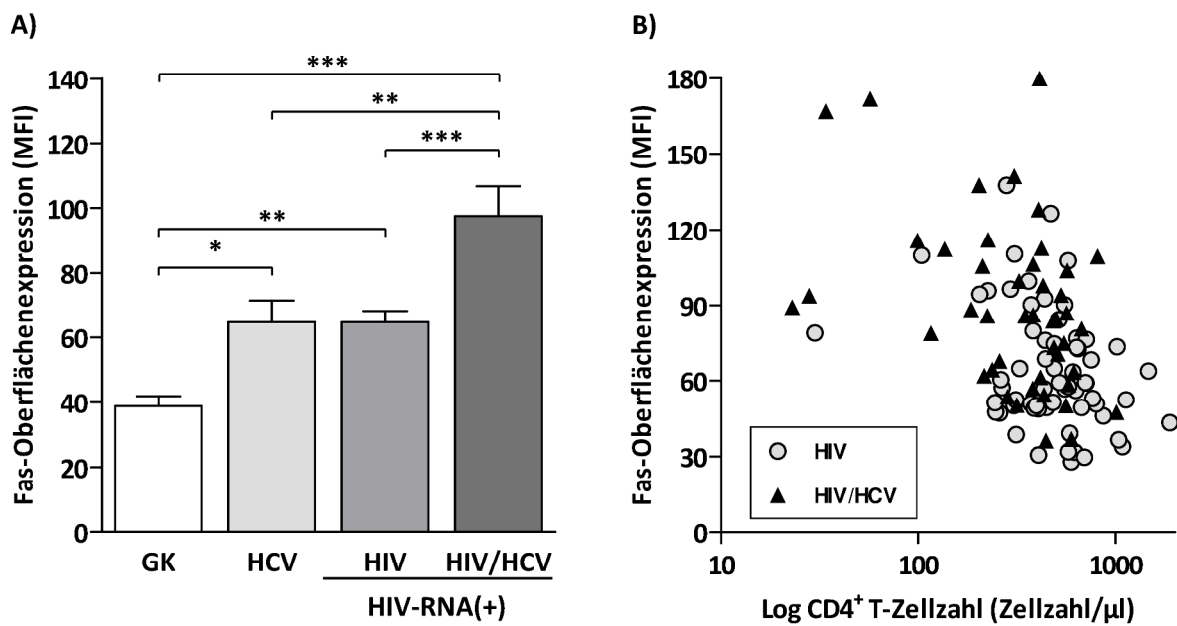


**Abb. 4.11: Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Das Histogramm zeigt repräsentativ die Expression des Fas-Rezeptors auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auf der Abszisse ist die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die Ordinate gibt den relativen Anteil der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz wieder, gemessen an der maximalen Zellzahl, die bei einem Fluoreszenz-Wert bestimmt wurde. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert.



Wie in Abbildung 4.12A ersichtlich, war eine replikative Infektion mit dem HI-Virus im Vergleich zu gesunden Individuen mit einer erhöhten Expression des Fas-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert. Eine signifikant erhöhte Fas-Oberflächenexpression konnte ebenfalls bei Patienten beobachtet werden, bei denen eine chronische HCV-Infektion diagnostiziert wurde. Interessanterweise besaßen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion im Mittel die höchste Oberflächendichte des Fas-Rezeptors. Nicht nur im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sondern auch relativ zu Patienten mit HIV- oder HCV-Monoinfektion war die Fas-Expression bei dieser doppelt-infizierten Gruppe signifikant erhöht (siehe auch Tabelle 4.7).



**Abb. 4.12: Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Patientengruppen.**

Abb. 4.12A zeigt die Oberflächenexpression von Fas auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI). Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler für die jeweilige Patientengruppe (GK: n=17, HCV: n=11, HIV: n=29, HIV/HCV: n=17). Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein *p*-Wert ≤ 0,05 wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren *p*-Werte ≤ 0,01 bzw. ≤ 0,001. Abb. 4.12B veranschaulicht die Assoziation zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl und Fas-Oberflächenexpression bei Patienten mit einer HIV-Monoinfektion (n=63) bzw. einer HIV/HCV-Koinfektion (n=45). Die Fas-Oberflächenexpression (MFI) ist auf der Ordinate gegen die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl (Abszisse) aufgetragen. Grau ausgefüllte Kreise beziehen sich auf HIV-monoinfizierte (*r*<sub>s</sub> = -0,29, *p* = 0,02), schwarze Dreiecke auf HIV/HCV-koinfizierte Patienten (*r*<sub>s</sub> = -0,41, *p* = 0,0054). Für die statistische Analyse wurde eine Rangkorrelation nach Spearman angewandt.

**Tab. 4.7: Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	Fas-Expression (MFI) <sup>a)</sup>	<i>p</i> -Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	17	38,8±3,1	
HCV-Monoinfiziert	11	64,8±6,7	<i>p</i> ≤ 0,05 vs. GK
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	29	64,7±3,5	<i>p</i> ≤ 0,01 vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	17	97,6±9,1	<i>p</i> ≤ 0,001 vs. HIV; <i>p</i> ≤ 0,001 vs. HCV

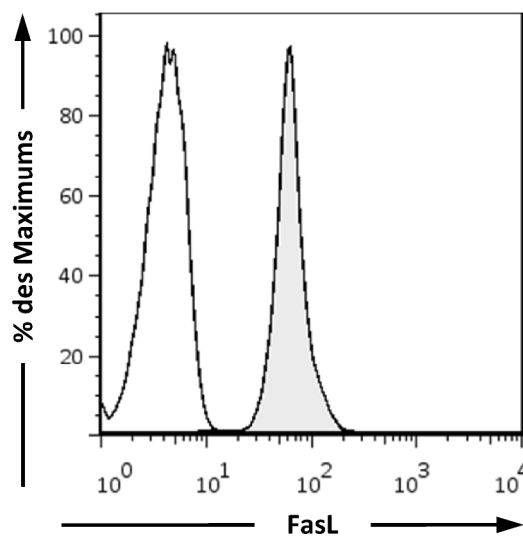
<sup>a)</sup> Mittelwert ± SEM

Des Weiteren ergab eine Korrelationsanalyse mit demographischen und klinischen Daten, dass die Fas-Expression mit der  $CD4^+$  T-Zellzahl HIV-positiver Patienten assoziiert war. Wie die Abbildung 4.12B illustriert, korreliert die Expression des Fas-Rezeptors dabei invers mit der Anzahl der  $CD4^+$  T-Zellen im peripheren Blut. Die Assoziation erreichte bei der HIV-monoinfizierten wie auch bei der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe statistische Signifikanz.

Im Gegensatz zur *ex vivo* Apoptoserate konnte bei der Fas-Expression in beiden Patientengruppen keine signifikante Wechselbeziehung zur HIV-Virämie beobachtet werden. Die HCV-Last, der HCV-Genotyp sowie andere klinische und demographische Parameter schienen ebenfalls keinen nachweisbaren Zusammenhang zur Fas-Expression zu haben.

#### 4.3.1.2 Serumspiegel und Oberflächenexpression des Fas-Liganden auf $CD4^+$ T-Zellen

Entsprechend der durchflusszytometrischen Analyse des Fas-Rezeptors wurde die Expression des korrespondierenden Liganden FasL auf  $CD4^+$  T-Zellen gemessen. Abb. 4.13 zeigt exemplarisch die relative Oberflächendichte des Liganden auf  $CD4^+$  T-Zellen.



**Abb. 4.13: FasL-Expression auf  $CD4^+$  T-Zellen.**

Das Histogramm zeigt repräsentativ die Expression des Fas-Liganden auf der Oberfläche von  $CD4^+$  T-Zellen. Auf der Abszisse ist die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die Ordinate gibt den relativen Anteil der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz wieder, gemessen an der maximalen Zellzahl, die bei einem Fluoreszenz-Wert gezählt wurde. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated.  $CD4^+$  T-Zellen wurden als  $CD3^+/CD4^+$ -positive Lymphozyten definiert.

Neben der membran-gebundenen Form des Fas-Liganden existiert des Weiteren auch eine lösliche Form des Liganden, welche im Serum von gesunden Probanden und Patienten mittels eines ELISA nachgewiesen werden kann. In Tabelle 4.8 sind die mittlere Oberflächenexpression des

zellulären Fas Liganden sowie die mittleren Serumspiegel der einzelnen Patientengruppen zusammengefasst.

Tab. 4.8: Expression und Sekretion des FasL in verschiedenen Patientengruppen

Patientengruppe	FasL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <sup>a),b)</sup>	Serumspiegel löslicher FasL (pg/ml) <sup>b)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	65,6±3,3	80,2±6,7	
HCV-Monoinfiziert	64,0±7,2	82,0±12,9	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	87,3±5,4	134,0±13,3	p ≤ 0,05 vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	87,7±7,8	137,2±17,0	p ≤ 0,05 vs. GK

<sup>a)</sup> MFI, <sup>b)</sup> Mittelwert ± SEM

Abbildung 4.14 verdeutlicht graphisch, dass sich die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die Serumspiegel des Fas-Liganden beim Vergleich zwischen den untersuchten Patientengruppen nach einem ähnlichen Muster verhalten. Während eine chronische Infektion mit dem Hepatitis C-Virus die Expression des membran-gebundenen FasL und die Serumspiegel der löslichen Form nur unwesentlich zu beeinflussen schien, war eine HIV-Infektion mit erhöhten Werten beider Formen des Fas-Liganden assoziiert. Substanzielle Unterschiede zwischen der HIV-monoinfizierten und der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe ließen sich dagegen nicht feststellen.

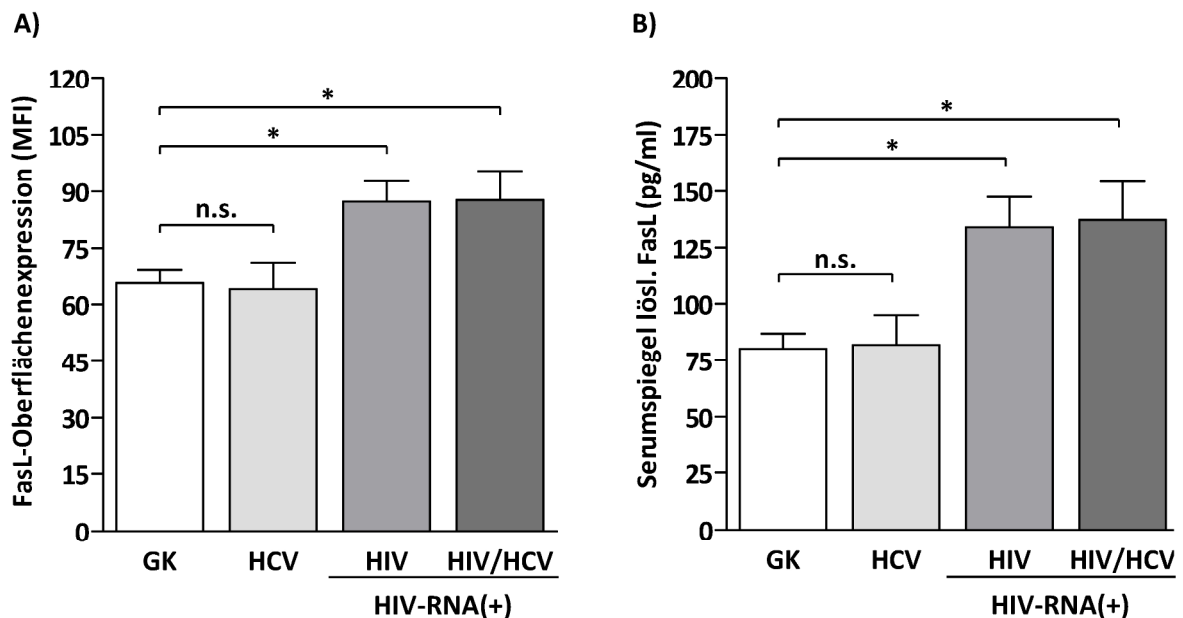
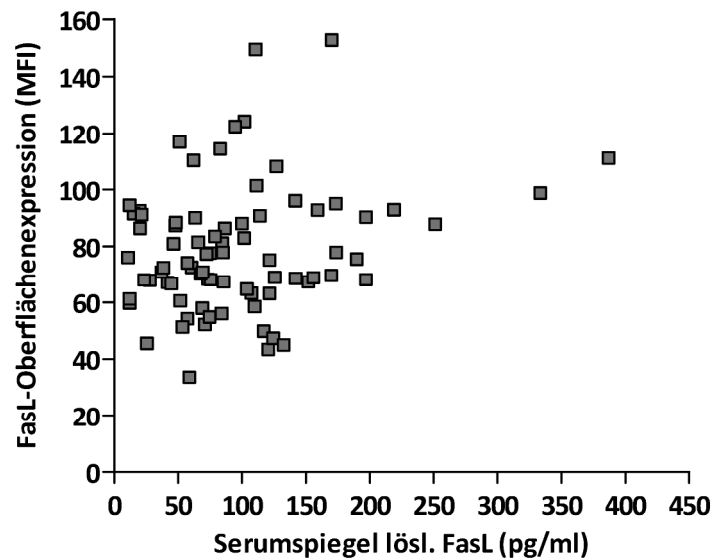


Abb. 4.14: Expression und Sekretion von zellulärem und löslichem FasL.

Abb. 4.14A gibt die Oberflächenexpression des FasL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) wieder. Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler der jeweiligen Patientengruppe (GK: n=12, HCV: n=9, HIV: n=17, HIV/HCV: n=12). Abb. 4.14B zeigt die Serumspiegel des löslichen FasL. Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler der jeweiligen Patientengruppe (GK: n=20, HCV: n=15, HIV: n=31, HIV/HCV: n=27). Für die statistische Analyse Gruppen wurde eine einfaktorielles ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein p-Wert ≤ 0,05 wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt.

Des Weiteren konnte mit einer Korrelationsanalyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des membranösen Fas-Liganden auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der löslichen Form des Liganden im Serum festgestellt werden (Abbildung 4.15).



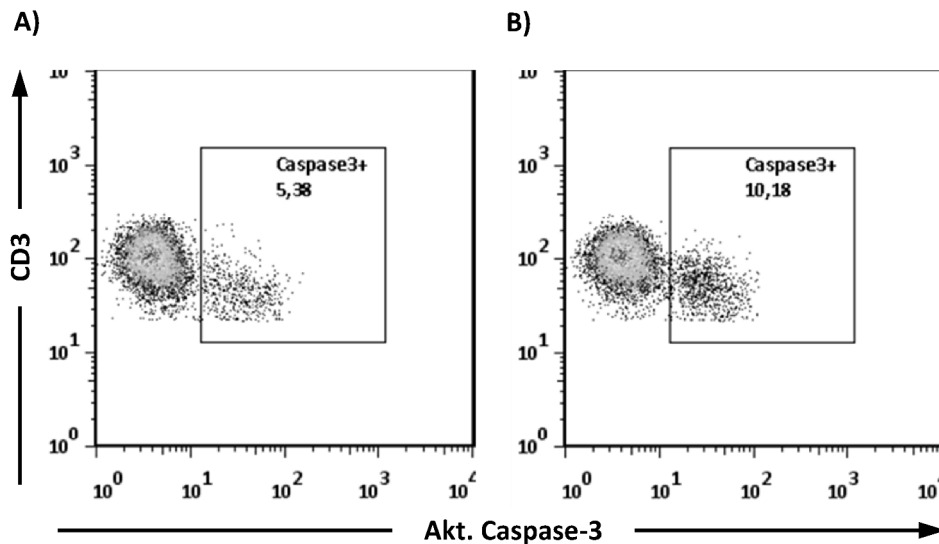
**Abb. 4.15: Assoziation zwischen FasL-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und FasL-Serumspiegel.**

Die Grafik zeigt den Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression des FasL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ordinate) und dem Serumspiegel der löslichen Form des Liganden (Abszisse) ( $R^2 = 0,059$ ,  $p = 0,033$ ). Für die statistische Analyse wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson angewandt.

#### 4.3.1.3 In vitro Induktion von Fas-vermittelter Apoptose

Fas/FasL-Interaktionen können zur Induktion von Apoptose in den Fas-exprimierenden Zellen führen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die HIV-Infektion wie auch eine chronische Infektion mit dem Hepatitis C-Virus mit einer erhöhten Dichte des Fas-Rezeptors auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verbunden war. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und wenn ja, eine erhöhte Expression des Fas-Rezeptors mit einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber FasL-induzierter Apoptose verbunden ist. Hierzu wurden isolierte PBMC von Patienten und gesunden Probanden mit rekombinatem humanem FasL inkubiert und im Anschluss der spezifische Anteil FasL-induzierter Apoptose mit Hilfe eines Caspase-3-Assays bestimmt (Abbildung 4.16 und siehe Punkt 3.7, Seite 31).

Wie in Tabelle 4.9 zusammengefasst, wurde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei allen Patientengruppen ein erhöhter Prozentsatz apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rhFasL gemessen.



**Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *in vitro* Induktion von Apoptose.**

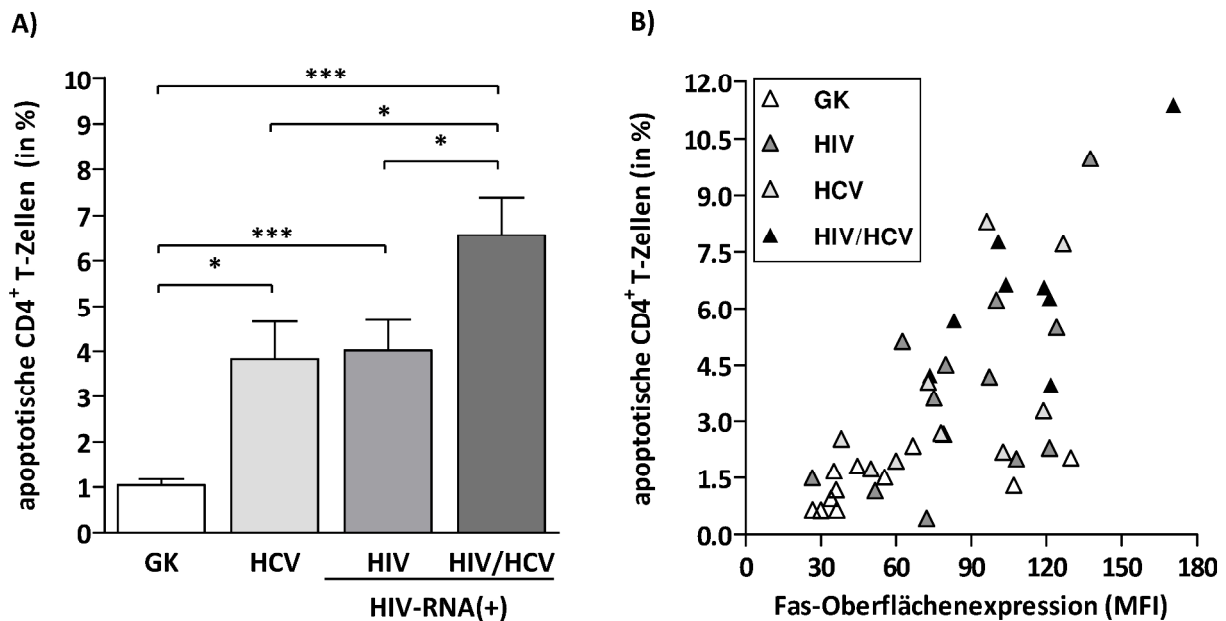
Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplots von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rekombinanten humanen FasL (B) und als Kontrolle ohne rhFasL (A). Apoptotische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden definiert als aktivierte Caspase-3-positiv und sind eingerahmt. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert.

**Tab. 4.9: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate nach Koinkubation mit rhFasL**

Patientengruppe	Anzahl	Fas-induzierte CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose (in %) <sup>a) b) c)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	11	1,0±0,14	p ≤ 0,001 vs. HIV/HCV
HCV-Monoinfiziert	9	3,8±0,83	p ≤ 0,05 vs. GK
HIV-Monoinfiziert – HIV-RNA(+)	13	4,0±0,67	p ≤ 0,001 vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert – HIV-RNA(+)	8	6,6±0,82	p ≤ 0,05 vs. HIV u. HCV

<sup>a)</sup> Mittelwert ± SEM, <sup>b)</sup> spezifische Apoptoserate (A<sub>i</sub>), <sup>c)</sup> Caspase-3-Assay

Die weitere statistische Analyse der Messungen offenbarte, dass eine Infektion mit HIV wie auch mit HCV mit einer erhöhten Empfindlichkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber FasL-induzierter Apoptose assoziiert war. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war die spezifische Fas-vermittelte Apoptose bei HIV- und HCV-monoinfizierten Patienten signifikant erhöht. Den höchsten Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Koinkubation mit rhFasL zeigte dagegen die Patientengruppe mit einer replikativen HIV/HCV-Koinfektion. Der Unterschied war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, wie auch zur HIV- und HCV-monoinfizierten Patientengruppe, signifikant. Die Ergebnisse waren damit analog zur Fas-Expression der einzelnen Patientengruppen.



**Abb. 4.17: *In vitro* Induktion von Apoptose bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Abb. 4.17A stellt den spezifischen Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem humanem FasL dar. Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe des Caspase-3-Assays detektiert. Jede Säule gibt den Mittelwert und Standardfehler der Apoptoserate für die jeweilige Patientengruppe (GK: n=11, HCV: n=9, HIV: n=13, HIV/HCV: n=8) wieder. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ . Abb. 4.17B veranschaulicht die Korrelation zwischen Fas-Oberflächenexpression und der FasL-induzierten Apoptose bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig von der HIV- oder HCV-Infektion. Die Oberflächenexpression von Fas ist auf der Abszisse gegen die spezifische Apoptoserate (Ordinate) von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem FasL aufgetragen ( $r_s = 0,67$ ,  $p \leq 0,001$ ). Dargestellt sind alle in Abb. 4.17A untersuchten Patienten (HIV: dunkelgraue Dreiecke; HCV: hellgraue Dreiecke; HIV/HCV: schwarze Dreiecke) und gesunden Kontrollen (offene Dreiecke). Für die statistische Analyse wurde eine Rangkorrelation nach Spearman angewandt.

Abb. 4.17B veranschaulicht diesen Zusammenhang zwischen Fas-Expression und FasL-induzierte Apoptose noch einmal deutlich. Unabhängig von einer zugrundeliegenden HIV- oder HCV-Infektion nimmt die spezifische Apoptoserate mit steigender Oberflächendichte des Fas-Rezeptors zu. Diese Korrelation ist dabei hochsignifikant ( $r_s = 0,67$ ,  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3.1.4 Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-RNA(-) Patienten

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten, dass neben der HIV-Infektion auch eine chronische Infektion mit dem Hepatitis C-Virus mit einer erhöhten Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert war. Die Analyse der Fas-Expression bei avirämischen Patienten, die effektiv mit einer HAART behandelt wurden, zeigte eine Abnahme der Oberflächendichte des Fas-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden Patientengruppen mit nachweisbarer HIV-RNA (Tabelle 4.10).

Tab. 4.10: Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-Patienten mit nicht-nachweisbare HIV-RNA

Patientengruppe	Anzahl	Fas-Expression <sup>a) b)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	17	38,8±3,1	$p \leq 0,001$ vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert – HIV-RNA(+)	29	64,7±3,5	n.s. vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert – HIV-RNA(-)	34	57,7±5,0	$p \leq 0,05$ vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert – HIV-RNA(+)	17	97,6±9,1	n.s. vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert – HIV-RNA(-)	28	75,7±5,6	$p \leq 0,05$ vs. HIV - HIV-RNA(-)

<sup>a)</sup> MFI, <sup>b)</sup> Mittelwert ± SEM

Wie Abbildung 4.18 jedoch zeigt, erreichte die Reduktion der Fas-Oberflächenexpression bei diesen beiden Gruppen im Vergleich zu den virämischen Patientengruppen nicht das geforderte Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Vielmehr blieb die mittlere Expression des Fas-Rezeptors bei Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-Last im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Darüber hinaus war die mittlere Fas-Expression bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zu HIV-monoinfizierten Individuen weiterhin signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ).

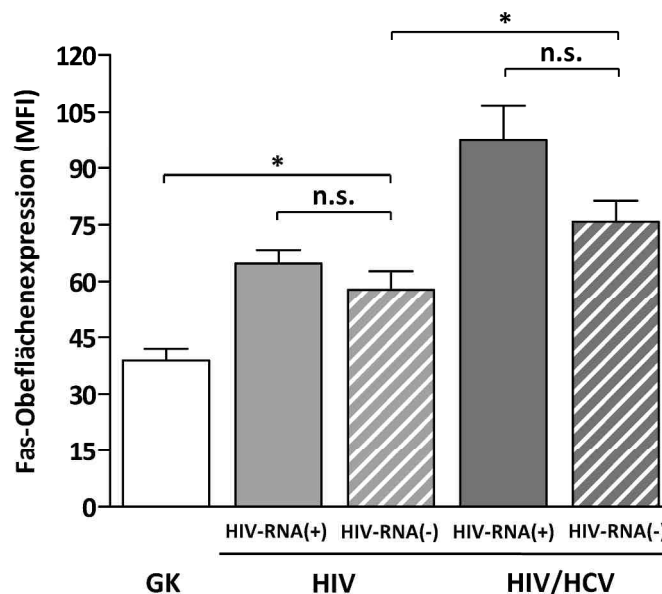


Abb. 4.18: Einfluss der HAART auf die Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Dargestellt ist die Fas-Oberflächenexpression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI). Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler für die jeweilige Patientengruppe (GK: n=17, HCV: n=11, HIV - HIV-RNA(+): n=29, HIV - HIV-RNA(-): n=34, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=17, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=28). Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt.

#### 4.3.1.5 Expression und Sekretion des FasL bei HIV-RNA(-) Patienten

Im Gegensatz zur Expression des Fas-Rezeptors war eine effektive antiretrovirale Behandlung der HIV-positiven Patienten mit einer signifikanten Reduktion der Oberflächendichte des FasL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert (Tabelle 4.11).

**Tab. 4.11: Expression des FasL in verschiedenen Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	FasL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <sup>a) b)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	12	65,6±3,3	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	17	87,3±5,4	$p \leq 0,05$ vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	16	67,6±2,1	n.s. vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	12	87,7±7,8	$p \leq 0,05$ vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	13	63,0±4,2	n.s. vs. GK

<sup>a)</sup> MFI, <sup>b)</sup> Mittelwert ± SEM

Auch die Serumspiegel der löslichen Form des Fas-Liganden nahmen im Vergleich zu den virämischen Patientengruppen unter einer HAART signifikant ab, so dass bei diesen wie auch bei der FasL-Expression kein nennenswerter Unterschied mehr im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden konnte (Tabelle 4.12).

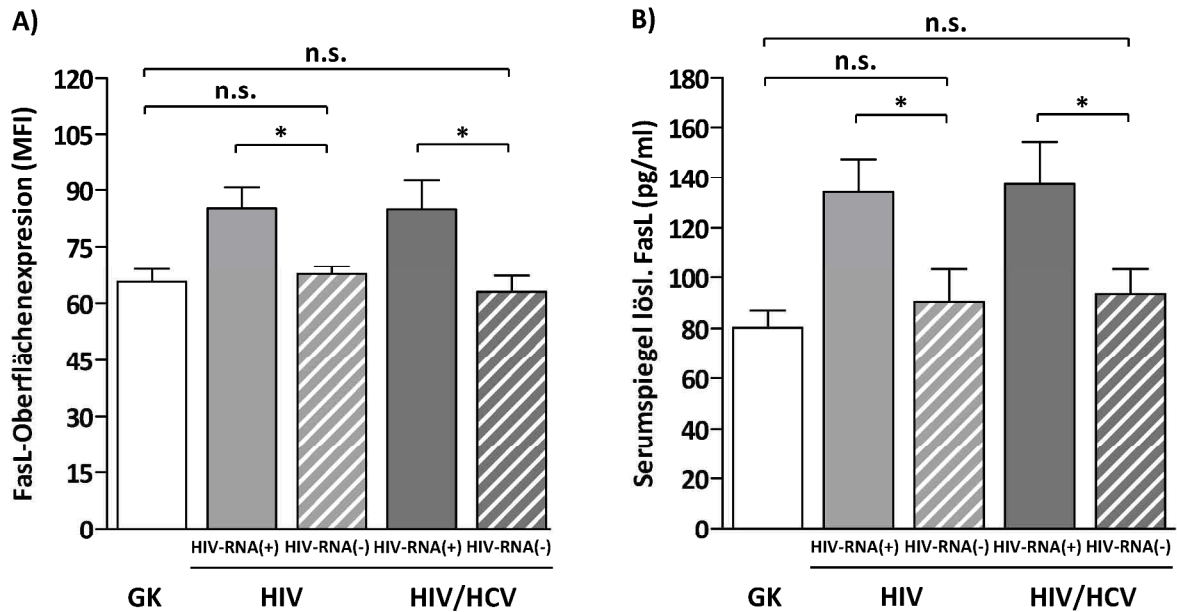
**Tab. 4.12: Serumspiegel des löslichen FasL in verschiedenen Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	Serumspiegel lös. FasL (pg/ml) <sup>a)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	20	80,2±6,7	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	31	134,0±13,3	$p \leq 0,05$ vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	22	90,4±12,8	n.s. vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	27	137,2±17,0	$p \leq 0,05$ vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	24	93,4±9,8	n.s. vs. GK

<sup>a)</sup> Mittelwert ± SEM

Im gleichen Maße wie sich die *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Zuge einer HAART dem Wert der HIV-monoinfizierten Patientengruppe annäherte, war auch bei der Expression und Sekretion des FasL kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen zu beobachten (Abbildung 4.19).





**Abb. 4.19: Einfluss der HAART auf die Expression und Sekretion von FasL.**

Dargestellt ist die mittlere Oberflächendichte des zellulären FasL (A) sowie der mittlere Serumspiegel des löslichen FasL (B) von Patienten ohne nachweisbare HIV-RNA im Vergleich zu HIV-RNA(+) Patienten und gesunden Kontrollen. Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler für die jeweilige Patientengruppe. Für die Bestimmung der FasL-Expression wurden folgende Patienten eingeschlossen: GK: n=12, HIV - HIV-RNA(+): n=17, HIV - HIV-RNA(-): n=16, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=13, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=12). Für die Bestimmung der Serumspiegel des FasL wurden Serum-Proben von folgenden Patienten verwendet: GK: n=20, HIV - HIV-RNA(+): n=31, HIV - HIV-RNA(-): n=22, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=27, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=24). Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt.

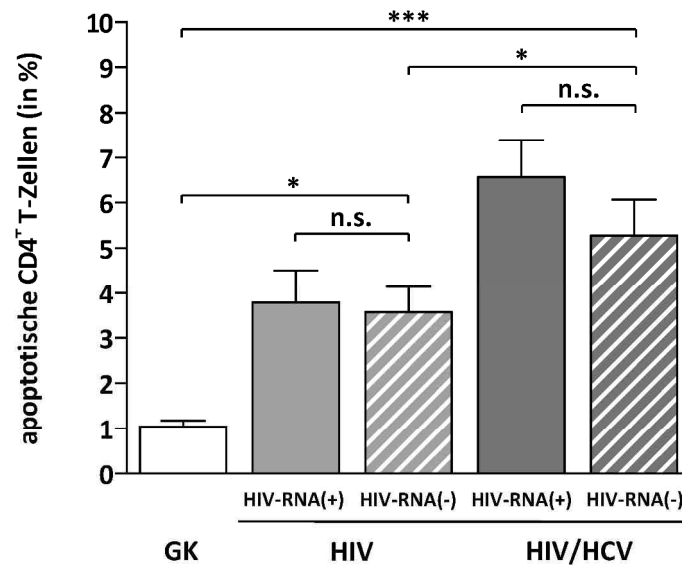
4.3.1.6 In vitro Induktion von Fas-vermittelter Apoptose bei HIV-RNA(-) Patienten

Analog zu den Versuchen bei den HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppen mit nachweisbarer HIV-RNA, wurde bei HIV-RNA(-) Patienten die in vitro Sensitivität gegenüber Fas-vermittelter Apoptose durch Koinkubation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit rhFasL untersucht. Wie aus Tabelle 4.13 hervorgeht, nahm die FasL-induzierte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei HIV-monoinfizierten wie auch HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zu den virämischen Patientengruppen ab.

**Tab. 4.13: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von HIV-positiven Patienten nach Koinkubation mit rhFasL**

Patientengruppe	Anzahl	FasL-induzierte CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose (in %) <sup>a-c)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	11	1,0±0,14	$p \leq 0,001$ vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	13	4,0±0,67	n.s. vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	10	3,6±0,57	$p \leq 0,05$ vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	8	6,6±0,82	n.s. vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	12	5,3±0,79	$p \leq 0,05$ vs. HIV - HIV-RNA(-)

<sup>a)</sup> Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>b)</sup> spezifische Apoptoserate (A), siehe Punkt 3.7, Seite 31, <sup>c)</sup> Caspase-3-Assay



**Abb. 4.20: Einfluss der HAART auf die *in vitro* Induktion von Apoptose bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Die Abbildung zeigt den spezifischen Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rekombinatem humanem FasL. Jede Säule gibt den Mittelwert und Standardfehler der Apoptoserate für die jeweilige Patientengruppe (GK: n=11, HIV - HIV-RNA(+): n=13, HIV - HIV-RNA(-): n=10, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=8, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=12) wieder. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Beim Vergleich der Resultate in Abb. 4.20 ist jedoch zu erkennen, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate der beiden behandelten Patientengruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe weiterhin signifikant erhöht blieb. Zudem war der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit rhFasL bei der HIV/HCV-koinfizierten signifikant größer als bei der vergleichbaren HIV-monoinfizierten Patientengruppe. Diese Ergebnisse waren damit analog zur Analyse der Fas-Expression bei HIV-RNA(-) Patienten und somit konsistent zu den vorangegangenen Beobachtungen, die eine signifikante Assoziation zwischen Fas-Expression und Sensitivität gegenüber FasL-induzierter Apoptose erkennen ließen.

Zusammenfassend war eine effektive antiretrovirale Therapie mit einer Verringerung der Expression des Fas-Rezeptors sowie dessen Liganden FasL verbunden. Im Gegensatz jedoch zu FasL, bei dem unter HAART eine Normalisierung der Expression und der Serumspiegel im Vergleich zu virämischen Patienten zu beobachten war, war die Veränderung der Oberflächendichte Fas unter Therapie nur gering. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verblieb die Fas-Expression signifikant erhöht. Diese Beobachtung korrelierte mit der weiterhin erhöhten *in vitro* Empfindlichkeit gegenüber FasL-vermittelter Apoptose. Weiterhin zeigte sich, dass eine effektive Inhibition der HIV-Replikation unter einer HAART nur unwesentliche Auswirkungen auf die HIV-assoziierte Erhöhung der Fas-Expression hat.

4.3.2 TRAIL und TRAIL-Rezeptoren 1 (DR4) und 2 (DR5)

4.3.2.1 Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Oberflächendichte der beiden TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Inkubation mit Antikörpern bestimmt, die spezifisch DR4 bzw. DR5 auf der Oberfläche der Zellen erkennt. Abbildung 4.21 veranschaulicht exemplarisch die Expression der beiden Rezeptoren auf T-Helferzellen im Vergleich zu einer Isotyp-Kontrolle. Wie in den Histogrammen zu erkennen, konnte zwischen der Isotyp-Kontrolle und dem spezifischen Antikörper gegen DR4 und DR5 kein nennenswerter Unterschied in der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) festgestellt werden.

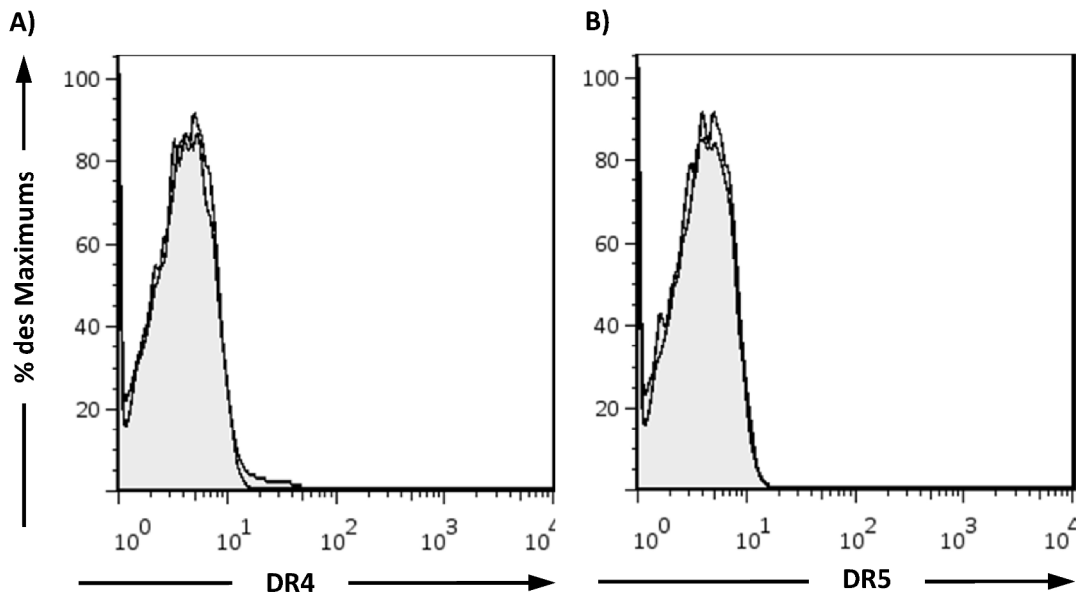


Abb. 4.21: Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Das Histogramm zeigt repräsentativ die Expression des von DR4 (A) und DR5 (B) (jeweils grau gefüllt) auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle (durchsichtig). Auf der Abszisse ist die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die Ordinate gibt den relativen Anteil der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz gemessen an der maximalen Zellzahl wieder, die bei einem Fluoreszenz-Wert gemessen wurde. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert.

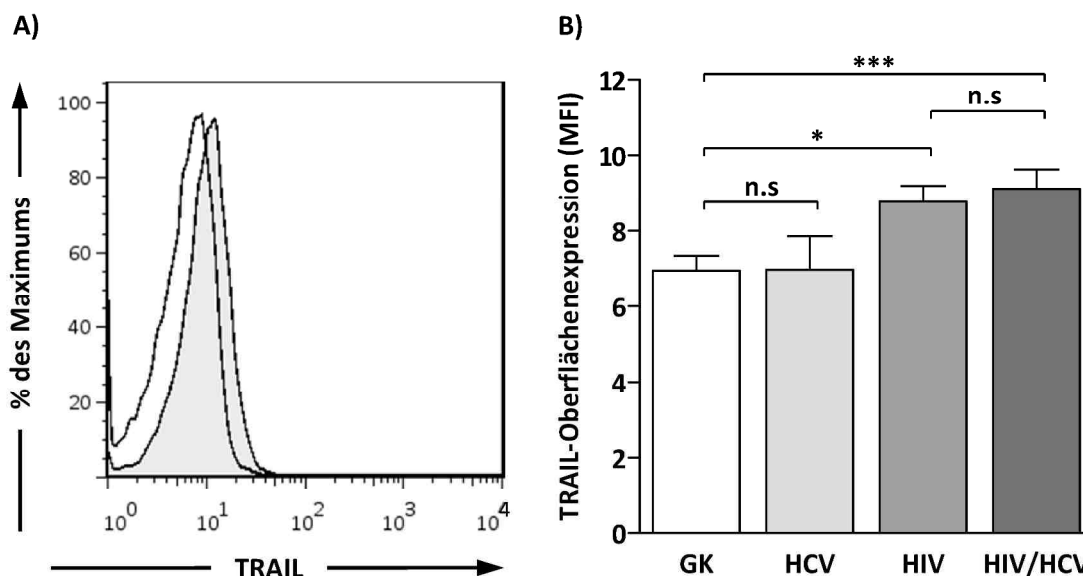
Tab. 4.14: Anteil DR4-positiver T-Helferzellen bei verschiedenen Patientengruppen

Patientengruppe	Anzahl	DR4 <sup>+</sup> T-Helferzellen <sup>a)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	13	0,39±0,05	
HCV-Monoinfiziert	9	0,46±0,08	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	22	0,43±0,04	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	20	0,35±0,05	n.s.
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	11	0,37±0,05	
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	12	0,43±0,06	

<sup>a)</sup> Mittelwert ± SEM

#### 4.3.2.2 Serumspiegel und Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Analyse der TRAIL-Expression zeigte, dass eine replikative HIV-Infektion mit einer erhöhten Oberflächendichte von TRAIL assoziiert ist. Wie in Abbildung 4.22 illustriert, war die Oberflächendichte von HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dagegen ließ sich ein möglicher Einfluss einer HCV-Infektion auf die TRAIL-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachweisen, weder bei der HCV-monoinfizierten noch bei der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe. Eine signifikante Korrelation zwischen der TRAIL-Expression und demographischen sowie klinischen Daten konnte ebenfalls nicht gefunden werden.

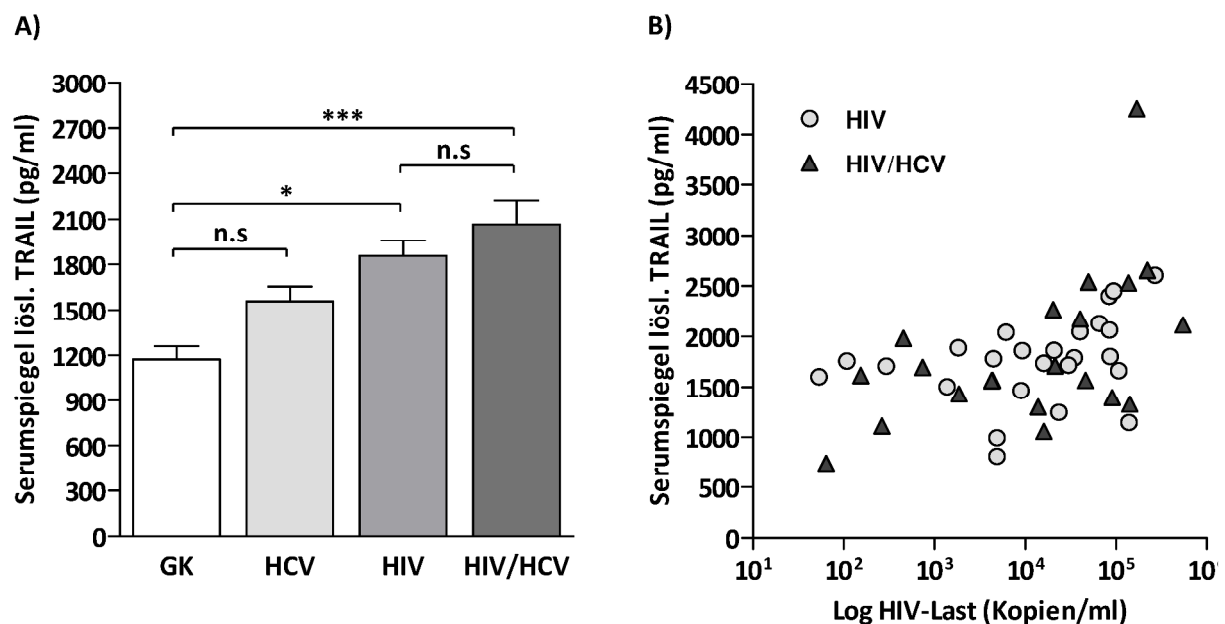


**Abb. 4.22: Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Das Histogramm (A) zeigt exemplarisch die TRAIL-Expression (grau schattiert) auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (durchsichtig). Auf der Abszisse ist die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die Ordinate gibt den relativen Anteil der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz wieder, gemessen an der maximalen Zellzahl, die bei einem Fluoreszenz-Wert gezählt wurde. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert. Abb. 4.20B gibt die Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) wieder. Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler der jeweiligen Patientengruppe (GK: n=15, HCV: n=10, HIV: n=21, HIV/HCV: n=16). Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ .

Die Analyse der TRAIL-Serumspiegel ergab, dass entsprechend der TRAIL-Oberflächenexpression eine HIV-Infektion ebenfalls mit einer signifikanten Erhöhung verbunden war. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass auch eine HCV-Infektion zu einer Erhöhung der TRAIL-Konzentration im Serum führte, bei HCV-monoinfizierten im Vergleich zu gesunden Probanden sowie bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion. Wie in Abbildung 4.23A gezeigt, erreichte der Anstieg jedoch nicht das geforderte Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ .

Eine Korrelationsanalyse mit klinischen und demographischen Daten der Patienten und Probanden deckte zudem eine positive Wechselwirkung zwischen den TRAIL-Serumspiegeln und der HIV-Last auf (Abbildung 4.22B). Diese erreichte bei der HIV-monoinfizierten sowie bei der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe statistische Signifikanz. Andere Parameter des HIV-Status oder des HCV-Status waren dagegen nicht mit der TRAIL-Konzentration im Serum assoziiert.



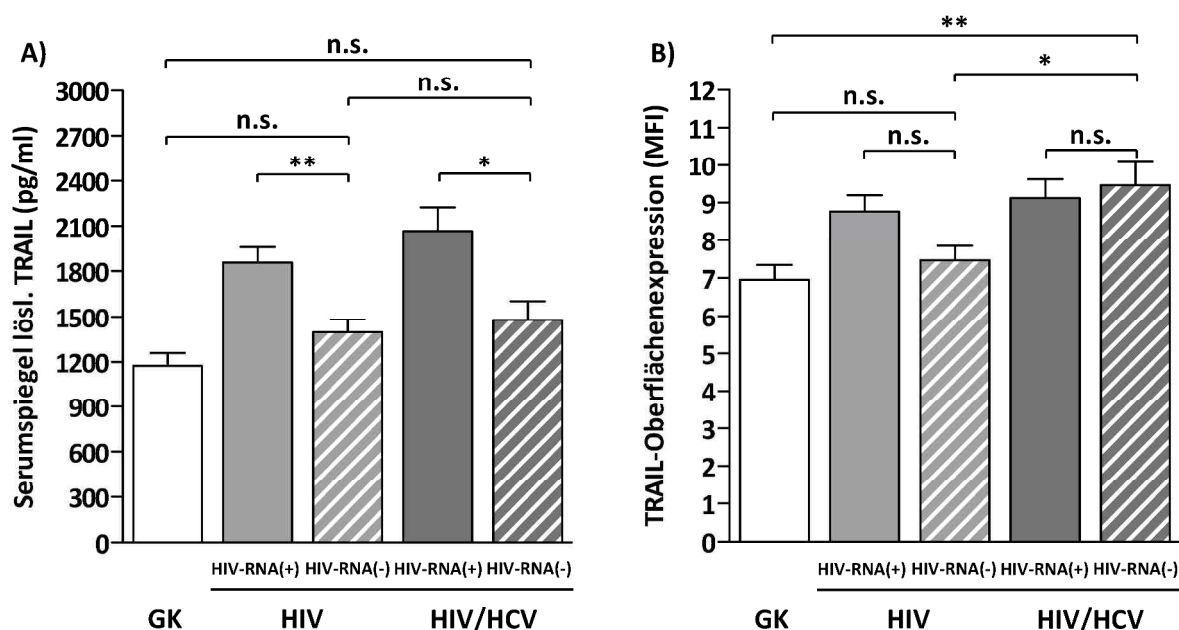
**Abb. 4.23: Serumspiegel löslichen TRAILS.**

Abb. 4.23A stellt die mittlere Konzentration von löslichem TRAIL im Serum von gesunden Probanden und Patienten dar (GK:  $n=15$ , HCV:  $n=19$ , HIV:  $n=31$ , HIV/HCV:  $n=28$ ). Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler für die jeweilige Patientengruppe. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* und \*\*\* repräsentieren  $p$ -Werte  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,001$ . Abb. 4.23B veranschaulicht die Assoziation zwischen der TRAIL-Serumkonzentration und der HIV-Last in den Patientengruppen mit HIV-Monoinfektion und HIV/HCV-Koinfektion (HIV:  $r_s = 0,42$ ,  $p = 0,037$ ; HIV/HCV:  $r_s = 0,53$ ,  $p = 0,013$ ). Die HIV-Last der Patienten ist auf der Abszisse aufgetragen, die Serumkonzentration von löslicher TRAIL auf der Ordinate. Für die statistische Analyse wurde eine Rangkorrelation nach Spearman angewandt.

#### 4.3.2.3 Expression und Sekretion von TRAIL bei HIV-RNA(-) Patienten

Die Untersuchung der TRAIL-Serumspiegel von behandelten HIV-Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-RNA offenbarte, dass eine effektive antiretrovirale Therapie mit einer Verringerung der TRAIL-Serumkonzentrationen assoziiert war (Abbildung 4.24). Im Vergleich zu den Patientengruppen mit nachweisbarer HIV-Last waren die mittleren Serumspiegel signifikant geringer, nicht nur bei HIV-monoinfizierten Patienten, sondern auch bei der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe. Obwohl die mittlere TRAIL-Konzentration im Serum beider avirämischen Patientengruppen weiterhin höher lag als die der gesunden Kontrollgruppe, erreichte dieser Unterschied nicht das geforderte Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ .

Die Ergebnisse der membranösen TRAIL-Expression bei Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-RNA zeigten dagegen nicht die Konsistenz wie sie bei den Serumspiegeln beobachtet worden war. Während die mittlere Expression bei HIV-monoinfizierten Patienten abnahm, stieg sie bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zur virämischen Patientengruppe leicht an. Ab- wie auch Zunahme der Expression waren allerdings im Vergleich zu den virämischen Patientengruppen statistisch nicht signifikant. Die Tabellen 4.15 und 4.16 fassen die Ergebnisse der TRAIL-Serumspiegel sowie der TRAIL-Expression auf T-Helferzellen noch einmal vergleichend zusammen.



**Abb. 4.24: Einfluss der HAART auf die TRAIL-Serumkonzentration und Oberflächenexpression.**

(A) Dargestellt ist der mittlere Serumspiegel löslichen TRAILS von HIV-Patienten, mit negativer HIV-RNA, im Vergleich zu HIV-RNA(+) Patienten und gesunden Kontrollen. Für die Bestimmung der Serumspiegel von TRAIL wurden Serums-Proben von folgenden Patienten verwendet: GK: n=15, HIV - HIV-RNA(+): n=31, HIV - HIV-RNA(-): n=21, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=28, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=27. (B) TRAIL-Expression auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Abb. gibt die Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) wieder (GK: n=15, HIV - HIV-RNA(+): n=21, HIV - HIV-RNA(-): n=19, HIV/HCV - HIV-RNA(+): n=16, HIV/HCV - HIV-RNA(-): n=14). Jede Säule repräsentiert Mittelwert und Standardfehler der jeweiligen Patientengruppe. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wird als signifikant gewertet und als \* dargestellt. \*\* repräsentiert einen  $p$ -Wert  $\leq 0,01$ .

**Tab. 4.15: TRAIL-Serumspiegel bei verschiedenen Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	Serumspiegel löslicher TRAIL <sup>a)</sup>	$p$ -Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	15	1171±87	
HCV-Monoinfiziert	19	1557±98	n.s. vs. GK
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	31	1857±100	$p \leq 0,01$ vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	21	1396±85	n.s. vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	28	2065±158	$p \leq 0,05$ vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	27	1478±123	n.s. vs. GK

<sup>a)</sup> pg/ml, Mittelwert  $\pm$  SEM

**Tab. 4.16: TRAIL-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen**

Patientengruppe	Anzahl	TRAIL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <sup>a) b)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	15	6,9±0,4	
HCV-Monoinfiziert	10	7,0±0,9	n.s. vs. GK
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	21	8,7±0,4	p ≤ 0,01 vs. HIV - HIV-RNA(-)
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	19	7,5±0,4	n.s. vs. GK
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	16	9,1±0,5	p ≤ 0,05 vs. HIV/HCV - HIV-RNA(-)
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	14	9,5±0,6	n.s. vs. GK

<sup>a)</sup> MFI, <sup>b)</sup> Mittelwert ± SEM

#### 4.3.2.4 *In vitro* Induktion von TRAIL-Rezeptor-vermittelter Apoptose

Die Bindung von zellulärem oder löslichem TRAIL an die korrespondierenden Rezeptoren DR4 und DR5 kann zur Induktion von Apoptose in den exprimierenden Zellen führen. DR4 und DR5 besitzen eine funktionierende Todesdomäne (*engl. death domain*), über die nach der Bindung von TRAIL an den Rezeptor der apoptotische Stimulus in die Zelle weitergeleitet werden kann.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus allen untersuchten Gruppen kein DR5 exprimieren und dass nur einer kleiner Prozentsatz (< 1 %) der CD4<sup>+</sup> T-Zellen DR4 auf der Oberfläche besitzt. Analog zur Fas-vermittelten *in vitro* Induktion von Apoptose wurde dennoch untersucht, ob sich über die Koinkubation mit rhTRAIL spezifisch Apoptose auslösen lässt. Die Ergebnisse der *in vitro* Induktion sind in Tabelle 4.17 verzeichnet. Die TRAIL-induzierte Apoptose war im Vergleich zu den Versuchen mit dem rhFasL (Tabelle 4.9) deutlicher niedriger. Es konnten zudem keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen gefunden werden. Gleiches galt auch für eventuelle Assoziationen mit klinischen und demographischen Parametern.

**Tab. 4.17: CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate nach Koinkubation mit rhTRAIL**

Patientengruppe	Anzahl	TRAIL-induzierte CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose (in %) <sup>a) b) c)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	9	0,1±0,05	
HCV-Monoinfiziert	4	0,2±0,15	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	11	0,2±0,09	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	10	0,5±0,12	n.s.
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	6	0,3±0,25	
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	13	0,2±0,05	

<sup>a)</sup> spezifische Apoptoserate (A<sub>i</sub>), <sup>b)</sup> Mittelwert ± SEM, <sup>c)</sup> Caspase-3-Assay

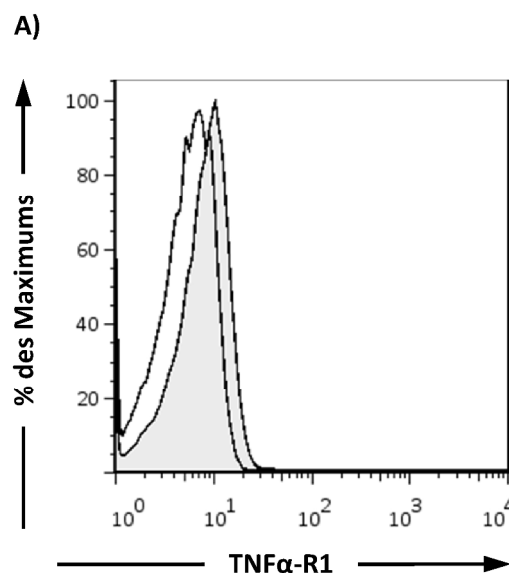
Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse bezüglich TRAIL und deren Rezeptoren DR4 und DR5 ergab folgendes Bild: Während eine HIV- wie auch eine HCV-Monoinfektion mit erhöhten Serumspiegeln löslichen TRAILS assoziiert waren, schien eine verstärkte Oberflächenexpression zellulären TRAILS auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur durch eine HIV-Infektion ausgelöst worden zu sein. Eine

Doppelinfektion mit HIV und HCV führte allerdings nicht zu signifikant weiter erhöhten TRAIL-Spiegeln oder signifikant verstärkter TRAIL-Expression. Eine antiretrovirale Therapie führte zu einer signifikanten Abnahme der TRAIL-Spiegel im Serum, ähnlich der wie sie beim löslichen FasL beobachtet worden war. Im Gegensatz dazu wurde keine nennenswerte Änderung bei der Expression der TRAIL-Rezeptoren gefunden. Die Konsequenz dieser Beobachtungen war, dass sich durch die Inkubation mit rhTRAIL bestenfalls nur bei einer geringen Zahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Apoptose auslösen ließ.

### 4.3.3 TNF- $\alpha$ und TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1

#### 4.3.3.1 Oberflächenexpression des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Oberflächendichte des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 (TNF- $\alpha$ -R1) auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Inkubation mit einem Antikörper bestimmt, der spezifisch TNF- $\alpha$ -R1 auf der Oberfläche der Zellen erkennt. Abb. 4.25 veranschaulicht exemplarisch die Expression des Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu einer Isotyp-Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied in der Expression von TNF- $\alpha$ -R1 zwischen den einzelnen Patienten- und Kontrollgruppen konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 4.18).



**Abb. 4.25: Oberflächenexpression des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Das Histogramm zeigt repräsentativ die Expression des TNF $\alpha$ -R1 (A) auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (grau) in Bezug zur Isotyp-Kontrolle (durchsichtig). Auf der Abszisse ist die relative Fluoreszenzintensität angegeben. Die Ordinate gibt den relativen Anteil der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz wieder gemessen an der maximalen Zellzahl, die bei einem Fluoreszenz-Wert gemessen wurde. Lymphozyten wurden über den Forward Scatter und den Side Scatter gated. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden als CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-positive Lymphozyten definiert.



**Tab. 4.18: Expression von TNF- $\alpha$ -R1 auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Patientengruppe	Anzahl	TNF- $\alpha$ -R1-Expression (MFI) <sup>a)</sup>	p-Werte
Gesunde Kontrollen (GK)	13	6,0 $\pm$ 0,2	
HCV-Monoinfiziert	7	7,2 $\pm$ 0,4	
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(+)	24	6,4 $\pm$ 0,2	n.s.
HIV-Monoinfiziert - HIV-RNA(-)	18	6,1 $\pm$ 0,2	
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(+)	11	6,5 $\pm$ 0,4	
HIV/HCV-Koinfiziert - HIV-RNA(-)	12	6,2 $\pm$ 0,2	

<sup>a)</sup> Mittelwert  $\pm$  SEM

#### 4.3.3.2 Serumspiegel und Oberflächenexpression von TNF- $\alpha$ auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Im Gegensatz zum TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1 wurde TNF- $\alpha$  auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht exprimiert. Auch im Serum der Probanden konnte die lösliche Form von TNF- $\alpha$  nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung war mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die nur kurzfristige Bildung von TNF- $\alpha$  und dessen geringe Halbwertszeit zurückzuführen.

Unsere Messungen ergaben, dass eine HCV-Koinfektion bei HIV-positiven Patienten keinen Einfluss auf die Expression von TNF- $\alpha$  hat. Auch auf die Expression des spezifischen Rezeptors hat eine Doppelinfektion keinen messbaren Einfluss. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Patienten beobachtet, die mit einer effektiven antiretrovirale Therapie behandelt worden waren.

## 5 DISKUSSION

Eine zunehmende Anzahl von HIV-positiven Menschen ist mit dem Hepatitis C-Virus infiziert. Nach letzten Schätzungen leiden mittlerweile 20 % aller Patienten mit einer HIV-Infektion zusätzlich an einer Hepatitis C<sup>77</sup>. Trotz zahlreicher klinischer Studien, die belegten, dass eine HIV/HCV-Koinfektion mit einem beschleunigten Verlauf der Hepatitis C assoziiert war, konnte im Gegenzug ein Einfluss der HCV-Infektion auf die Progression der HIV-Infektion nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der HCV-Koinfektion auf wichtige Mechanismen der HIV-vermittelten Depletion der T-Helferzellen zu untersuchen. Hierzu zählt zum einen die verminderte Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Folge einer HIV-assoziierten Dysfunktion des Thymus, sowie zum anderen der Niedergang von T-Helferzellen durch die Induktion von Apoptose. Beide Mechanismen sind zentrale Säulen der T-Zell-Homöostase und sind bei HIV-positiven Patienten gestört.

### 5.1 Untersuchungen zur CD4<sup>+</sup> T-Zell-Neubildungsrate bei HIV/HCV-Koinfektion

Anfang der neunziger Jahre konnte durch *in vitro* Experimente gezeigt werden, dass Thymozyten mit dem HI-Virus infiziert werden können und dass besonders unreife T-Zellen mit einem CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Phänotyp empfänglich für eine Infektion mit dem HI-Virus waren<sup>123</sup>. Weitere Studien mit AIDS-Patienten ließen vermuten, dass aufgrund der Zerstörung der Struktur des Thymus, der Abwesenheit von Thymozyten und der Infiltration von aktivierten T-Zellen eine Beeinträchtigung der T-Zell-Produktion des Thymus im Zusammenhang mit der HIV-Pathogenese steht<sup>124,125</sup>.

Durch die quantitative Bestimmung von TRECs (*engl. T cell receptor excision circles*) als indirektem Marker für die Neubildung von T-Lymphozyten konnten Douek *et al.* erstmalig im Jahr 1998 zeigen, dass eine HIV-Infektion mit einer signifikanten Reduktion der TREC-Konzentration bei CD4<sup>+</sup> und auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Probanden assoziiert war<sup>99</sup>. Weitere Studien beobachten ebenfalls eine Abnahme von TRECs im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Probanden, vor allem bei Patienten, die sich bereits im Stadium AIDS befanden oder einen beschleunigten Verlauf der HIV-Infektion aufwiesen<sup>126,127,128,129</sup>. Hatzakis *et al.* zeigten zudem, dass die Konzentration von TRECs als Prädiktor für die Progression der HIV-Infektion fungieren kann<sup>103</sup>.

Die in unseren Untersuchungen ermittelten TREC-Konzentrationen von HIV-negativen und HIV-positiven Individuen (ca.  $10^2 - 10^3$  sJTRECs/ $10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen) waren zwar mit den TREC-Werten anderer Publikationen vergleichbar<sup>126,127</sup>, in einigen anderen Publikationen wurden aber als Bezugssystem PBMC gewählt<sup>128,129,130,131</sup>. Die bereits im Ergebnisteil erwähnte große Streuung der Werte wurde allerdings in allen Publikationen beobachtet. Bei den in unserer Studie

eingeschlossenen HIV-infizierten Patienten konnte keine signifikante Reduktion der TREC-Konzentration im Vergleich zur gesunden Probanden festgestellt werden. Diese Beobachtung stand nicht im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Publikationen<sup>128,131</sup>. Die Studie von Nobile *et al.* kam dagegen zu ähnlichen Ergebnissen<sup>126</sup>. Die Autoren zeigten, dass sich die mittlere TREC-Konzentration von unbehandelten HIV-Infizierten mit einer CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl von über 200 Zellen/ $\mu$ l nicht von der von HIV-negativen Individuen unterschied. Bei Patienten mit einer T-Helferzahl über 500 Zellen/ $\mu$ l war die TREC-Konzentration sogar erhöht. Die mediane CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl unserer Kohorte lag mit 371 Zellen/ $\mu$ l in dem Bereich zwischen 200 und 500 Zellen/ $\mu$ l. Wie bereits erwähnt, ist ein signifikanter Abfall der TREC-Konzentrationen vor allem bei Patienten zu beobachten, die bereits AIDS-definierende Symptome aufwiesen. Die in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten befanden sich dagegen alle in der symptomfreien Latenzphase und hatten bis zum Zeitpunkt der Blutabnahme kein AIDS-definierendes Ereignis.

Um einen möglichen Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Neubildungsrate von T-Helferzellen bei HIV-positiven Patienten zu untersuchen, wurden von insgesamt 10 unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten die TREC-Konzentration bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut gemessen. Diese lag im Median unterhalb der Konzentration von gesunden Probanden und HIV-monoinfizierten Patienten. Die Differenz zwischen den Werten erreichte jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau. Bislang gibt es nur eine einzige weitere Studie, die die TREC-Konzentrationen bei insgesamt 20 HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit nachweisbarer HIV-Last untersuchte<sup>132</sup>. In dieser fanden Soriano-Sarabia *et al.* ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den TREC-Konzentrationen zwischen HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten. Vielmehr ermittelten sie ähnliche TREC-Konzentrationen bei den beiden HIV-infizierten Patientengruppen. Erwähnenswert ist allerdings, dass in der Publikation die TREC-Konzentrationen in Bezug zu PBMC gesetzt wurden und auf die Angabe von exakten TREC-Konzentrationen verzichtet wurde. Auch die mittlere T-Helferzellzahl der Patientengruppen wurde nicht angegeben, so dass ein detaillierter Vergleich dieser Studie mit den hier vorliegenden Ergebnissen nur eingeschränkt möglich war.

Als einzige Studie, die sich mit der Neubildung von T-Lymphozyten bei der HCV-Monoinfektion beschäftigte, ist die von Cianci *et al.* aus dem Jahr 2005 zu nennen<sup>133</sup>. Die Autoren beobachteten eine Reduktion von RTE und vermuteten daher eine Beeinträchtigung der Funktion des Thymus. Damit stehen diese Ergebnisse allerdings im Widerspruch zu den hier vorliegenden Resultaten, bei denen keine signifikante Reduktion der TREC-Konzentration bei HCV-Infektion festgestellt werden konnte. Allerdings bezogen sich die in der Arbeit genannten Werte ebenfalls wieder auf PBMC und nicht auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Auswirkungen einer effektiven antiretroviralen Kombinationstherapie auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellneubildungsrate von Patienten mit einer HIV-Monoinfektion bzw. HIV/HCV-Koinfektion wurden

ebenfalls untersucht. Eine effektive Inhibition der HIV-Replikation im Rahmen der HAART führt in der Regel zu einem Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl. Die HAART-assoziierte Immunrekonstitution scheint auch im Zusammenhang mit einer gesteigerten Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus zu stehen. Mehrere Studien an HIV-positiven Erwachsenen und Kindern beobachteten einen Anstieg der TREC-Konzentrationen<sup>101,134,135,136,137</sup>. Steffens *et al.* zeigten, dass zwischen HIV-positiven Individuen mit maximaler viraler Suppression und HIV-negativen Probanden kein signifikanter Unterschied mehr in der TREC-Konzentration bestand<sup>100</sup>.

Unsere Ergebnisse bestätigten zumindest teilweise diese Beobachtungen. Auch die in dieser Arbeit analysierte HIV-RNA(-) HIV-infizierte Patientengruppe zeigte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in ihrer mittleren TREC-Konzentration. Dies galt jedoch nicht für die HIV/HCV-koinfizierte Patientengruppe, deren mittlere TREC-Konzentration deutlich geringer war als die der HIV-negativen Kontrollgruppe. Eine weitere Arbeit von Cianci *et al.* aus dem Jahre 2008 kam jedoch zu einem anderen Befund, in dem eine HCV-Koinfektion bei HIV-Patienten ohne nachweisbare HIV-RNA keinen Einfluss auf die TREC-Konzentration hatte. Allerdings wurde in dieser Studie die TREC-Konzentration ebenfalls wieder in Bezug zu PBMC angegeben. Des Weiteren wurden als Kontrollgruppe gesunde Probanden rekrutiert. Ebenso fehlten auch hier wiederum Angaben zur CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl.

Die Gegenüberstellung der vorliegenden Ergebnisse mit den bisherigen Arbeiten anderer Autoren offenbarte die Schwierigkeiten einer Vergleichbarkeit der Befunde und Beobachtungen durch unterschiedliche methodische Ansätze.

Zum einen ist die Bestimmung der Konzentration von kürzlich ausgewanderten Thymozyten (RTE) durch die Quantifizierung unterschiedlicher Formen von TRECs möglich. Im Zuge der genetischen Neuordnung bei der T-Zell-Rezeptorbildung entstehen neben sjTRECs (*engl. signal joint T cell receptor excision circles*) nachfolgend auch cjTRECs (*engl. coding joint T cell receptor excision circles*). Die Konzentration von cjTRECs ist etwa 8 bis 16-mal höher, welches drei bis vier Zellteilungen entspricht<sup>99</sup>.

Zum anderen werden TREC-Konzentrationen in unterschiedlichen Bezugssystemen ausgehend von der analysierten Zellsuspension dargestellt. Während in der vorliegenden Arbeit die TREC-Konzentration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt wurde, um eine Aussage bezüglich der Neubildungsrate von T-Helferzellen zu machen, wurde in einigen Arbeiten die TREC-Konzentration in Bezug zu PBMC gesetzt. Diese Darstellung erlaubt zwar eine Aussage über die Produktion von T-Lymphozyten im Allgemeinen, allerdings keine über die Neubildung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Speziellen.

Neben den methodischen Aspekten sollen hier noch einige biologischer Phänomene erwähnt werden, die die Interpretation von TREC-Werten im Zusammenhang mit der Produktion von T-Lymphozyten beeinflussen. TRECs sind episomale Schnittprodukte, die im Zuge der Mitose nicht

repliziert werden. Sukzessive Zellteilungen führen demnach zu einer Verdünnung von TRECs und somit zur Abnahme der TREC-Konzentration. Hazenberg *et al.* postulierten erstmalig im Jahr 2000, dass die HIV-assoziierte Reduktion von TRECs eine Folge vermehrter Zellteilung sein könnte und nicht auf eine Beeinträchtigung der *de novo* Produktion von T-Lymphozyten zurückzuführen ist<sup>138</sup>. Eine der Ursachen für die vermehrte Proliferation von T-Zellen ist in der generalisierten Immunaktivierung im Verlauf der chronischen HIV-Infektion zu finden<sup>139</sup>. Ebenfalls in diesem Zusammenhang steht die HIV-assoziierte erhöhte Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die ebenfalls Auswirkungen auf den TREC-Gehalt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben kann<sup>140</sup>. Einige Studien haben diese Effekte bei der Analyse von TRECs bei HIV-infizierten Patienten berücksichtigt und kamen zu dem Schluss, dass eine reduzierte Neubildung von T-Zellen durch den Thymus zumindest anteilig für die erniedrigten TREC-Konzentrationen bei HIV-positiven Patienten verantwortlich sei<sup>127,141</sup>.

Vor diesem Hintergrund ist eine abschließende Aussage über den Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Neubildungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur eingeschränkt möglich. Die in der vorhandenen Literatur beschriebenen Effekte einer HCV-Infektion bei HIV-negativen und HIV-positiven Patienten auf die TREC-Konzentrationen widersprechen sich und sind nur bedingt mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen vergleichbar<sup>132,133,142</sup>. Inwieweit die gemessenen niedrigeren TREC-Konzentrationen bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten eine Konsequenz einer HCV-abhängigen Beeinträchtigung des Thymus oder durch eine verstärkte Zellteilung bzw. Apoptose herrühren, lässt sich nicht eindeutig klären. Während jedoch bei HCV-monoinfizierten Patienten die mittlere TREC-Konzentration wie auch die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate unbeeinflusst von der zugrundeliegenden Infektion blieben, wurde eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten beobachtet. Als eine mögliche Ursache für die im Vergleich zu gesunden Probanden und HIV-monoinfizierten Patienten geringere TREC-Konzentration ist eine verstärkte Apoptose bei T-Helferzellen nicht auszuschließen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Apoptoserate und TREC-Konzentration konnte allerdings nicht gefunden werden, weder bei den gesunden und HIV-monoinfizierten Kontrollgruppen als auch bei den HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppen.

Dass der Thymus ein Ort der HIV-Replikation ist und die HIV-Infektion vor allem bei Patienten mit AIDS mit einer Dysfunktion des Thymus assoziiert ist, konnten mehrere Studien unabhängig von der Analyse von TRECs belegen<sup>124,125</sup>. Einen Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Neubildungsrate konnte aber mit den vorliegenden Ergebnissen und unter Berücksichtigung der vorhandenen Literatur nicht eindeutig nachgewiesen werden.

## 5.2 Untersuchungen zur CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion

Apoptose ist einer der wesentlichen Mechanismen, die dem graduellen Verlust von T-Helferzellen im Verlauf der chronischen HIV-Infektion zugrunde liegen. Seit Beginn der neunziger Jahre konnte eine Vielzahl von Studien belegen, dass die HIV-Infektion mit einer im Vergleich zu nicht-infizierten Individuen erhöhten Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert ist<sup>106 107 108 109 110 111</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden und HIV-monoinfizierten Kontrollgruppen, sowie von HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppen über verschiedene Assays identifiziert. Allen Assays gemein ist, dass sie spezifisch irreversible physiologische und zelluläre Veränderungen in den Zellen detektieren, die mit der Induktion von Apoptose einhergehen.

### 5.2.1 CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei Patienten mit nachweisbarer HIV-RNA

Die mit Hilfe von Apoptose-Assays ermittelten Ergebnisse bestätigten die in vorangegangenen Studien beschriebene gesteigerte Apoptoserate in T-Helferzellen von HIV-monoinfizierten Patienten. Im Vergleich zu HIV-negativen Probanden war die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei unbehandelten HIV-positiven Patienten signifikant erhöht. Zudem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate und HIV-Last gefunden werden, der ebenfalls bereits von Samuelsson *et al.* beobachtet worden war<sup>143</sup>.

Von besonderem Interesse war jedoch, dass in unseren Untersuchungen HIV-positive Patienten mit einer HCV-Koinfektion die höchste gemessene CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von allen Patientengruppen zeigten. Die naheliegende Vermutung, dass es sich bei der erhöhten Apoptoserate um einen additiven Effekt von HIV- und HCV-induzierter Apoptose handeln könnte, konnte allerdings ausgeschlossen werden, denn eine HCV-Monoinfektion allein führte im Vergleich zu gesunden Probanden zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate.

Die in unseren Untersuchungen gemessene gesteigerte Apoptoserate bei T-Helferzellen wurde ebenfalls in einer Arbeit von Nunez *et al.* beobachtet. In dieser Arbeit wurde von einem erhöhten Anteil Annexin V-positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten berichtet<sup>144</sup>. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches im Zuge der Auflösung der Asymmetrie der Plasmamembran in der frühen Phase der Apoptose auf der Oberfläche der Zelle zu finden ist, aber auch im Rahmen einer Zellaktivierung auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran detektiert werden kann<sup>145</sup>. Im Gegensatz zu Nunez *et al.* basieren die hier vorliegenden Ergebnisse auf der Detektion von Markern, welche spezifisch für eine irreversible Induktion von Apoptose sind. Des Weiteren verzichteten die Autoren auf den Einschluss von gesunden und HCV-monoinfizierten

Kontrollgruppen und konnten daher eine direkte additive Verstärkung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose durch HCV zu jenem Zeitpunkt nicht ausschließen.

Einen weiteren zugrundeliegenden Mechanismus konnten die Autoren dagegen ausschließen: Bei HIV-monoinfizierten Patienten konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Apoptose bei T-Helferzellen mit der HIV-induzierten Immunaktivierung assoziiert war<sup>146,147</sup>. Douek *et al.* zeigten zudem, dass HIV präferentiell aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen infiziert<sup>148</sup>. Eine zusätzliche HCV-induzierte Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hätte demnach zu einer verstärkten Infektionsrate, erhöhter Virusreplikation und Produktion pro-apoptotischer HIV-Proteine führen können. In der Arbeit von Nunez *et al.* konnten allerdings keine Unterschiede zwischen der HIV-monoinfizierten und der HIV/HCV-koinfizierten Patientengruppe bezüglich der T-Zell-Aktivierung festgestellt werden<sup>144</sup>.

Hinweise auf einen synergistischen Mechanismus zwischen HIV und HCV, der zu einer verstärkten Apoptose in HIV/HCV-koinfizierten Patienten führen könnte, lieferten dagegen Experimente an HepG2-Zellen. An dieser Zelllinie konnte eine gemeinschaftliche Induktion von Apoptose durch HIV- und HCV-Hüllproteine beobachtet werden<sup>149</sup>. Allein vermochten die jeweiligen Hüllproteine, Apoptose jedoch nicht zu induzieren. Es bleibt insofern zu bemerken, dass es sich bei HepG2-Zellen um eine Hepatozyten-Zelllinie handelt und dass das HIV-Protein env in CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien sehr wohl in der Lage war, Apoptose zu induzieren<sup>116,150</sup>.

Zusammen lassen diese Befunde vermuten, dass, obwohl eine alleinige Infektion mit HCV keine messbare Induktion von Apoptose in T-Helferzellen auslöst, die HCV-Koinfektion bei HIV-positiven Patienten zumindest indirekt einen pro-apoptotischen Effekt ausübt und zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber einer HIV-assoziierten Induktion von Apoptose führt. Die signifikante Korrelation zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate und HIV-Last bei HIV-monoinfizierten als auch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten verstärken zudem den Eindruck, dass die verstärkte Apoptose in T-Helferzellen hauptsächlich HIV-induziert ist.

### 5.2.2 Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion

Neben einer gesteigerten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  kamen als Erklärungsmodell auch Veränderungen bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose in Betracht. In der Tat scheinen Interaktionen zwischen den Todesrezeptoren Fas, DR4 und DR5 und den korrespondierenden Liganden Fas-Ligand und TRAIL eine Rolle in der Pathogenese der HIV-Infektion und der HCV-Infektion zu spielen<sup>151 152 153 154 155</sup>. Aus diesem Grund wurde die Expression und Sekretion der Rezeptor/Liganden-Paare des Fas-, TRAIL- und TNF- $\alpha$ -Systems eingehender untersucht.

Die Ergebnisse unserer Messungen bestätigten frühere Beobachtungen und untermauern die bedeutende Rolle des Fas-Systems in der Pathogenese der fortschreitenden HIV-Infektion: Unsere Ergebnisse zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression des Fas-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer zugrundeliegenden HIV-Infektion<sup>156,157</sup>. Des Weiteren konnte eine inverse Korrelation zwischen der Fas-Expression und der T-Helferzell-Zahl festgestellt und damit die Oberflächenexpression des Rezeptors als einen potentiellen Prädiktor für die Progression der HIV-Infektion identifiziert werden<sup>158,159</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte durch *in vitro*-Experimente bewiesen werden, dass die Hochregulation der Fas-Oberflächendichte auf T-Helferzellen von HIV-infizierten Patienten mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber FasL-induzierter Apoptose einhergeht.

Auch Veränderungen des korrespondierenden Liganden FasL konnten in unseren Analysen festgestellt werden und standen damit im Einklang mit früheren Beobachtungen anderer Autoren<sup>160</sup><sup>161</sup><sup>162</sup><sup>163</sup>. Neben einer erhöhten Oberflächenexpression von FasL auf T-Helferzellen wurden auch erhöhte Konzentrationen der löslichen Form des Liganden im Serum von HIV-positiven Patienten nachgewiesen.

Zusammenfassend wiesen die Vorarbeiten anderer Autoren und die vorliegenden Ergebnisse stark auf ein Zusammenwirken der erhöhten Expression und Sekretion des Fas-Liganden und der gesteigerten Oberflächenexpression des korrespondierenden Rezeptors hin. Die synergistische Fas/FasL-Interaktion ist damit wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus, der an der verstärkten Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt ist, wie sie bei Patienten mit einer HIV-Infektion beobachtet wurde.

Das Fas-System scheint ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der Hepatitis C zu spielen. In mehreren Studien konnte eine erhöhte Apoptoserate von Hepatozyten beobachtet werden, die mit einer gesteigerten Fas-Expression in der HCV-infizierten Leber einhergegangen waren<sup>153,164,165</sup>. Die Autoren um Taya *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass eine chronische Infektion auch mit einer erhöhten Fas-Expression auf peripheren mononukleären Zellen (PBMC) assoziiert war<sup>166</sup>. Fas-positive PBMC waren zudem empfindlicher gegenüber der Induktion von Apoptose mit einem agonistischen Fas-Antikörper. Panasiuk *et al.* konnten kürzlich in einer detaillierteren Analyse zeigen, dass periphere T-Lymphozyten von Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion eine erhöhte Expression des Fas-Rezeptors aufweisen<sup>167</sup>. Diese Beobachtungen bestätigen damit unsere Ergebnisse, dass die HCV-Infektion mit einer Hochregulation der Fas-Expression auf T-Helferzellen assoziiert war und mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber FasL-induzierter Apoptose verbunden war.

Dennoch konnte im Vergleich zu gesunden Probanden keine Steigerung der *in vivo* Apoptoserate bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Patienten mit HCV festgestellt werden. Gegenteilige Beobachtungen wurden weder in den vorgestellten Studien noch in anderen Arbeiten publiziert. Ein Grund für die im



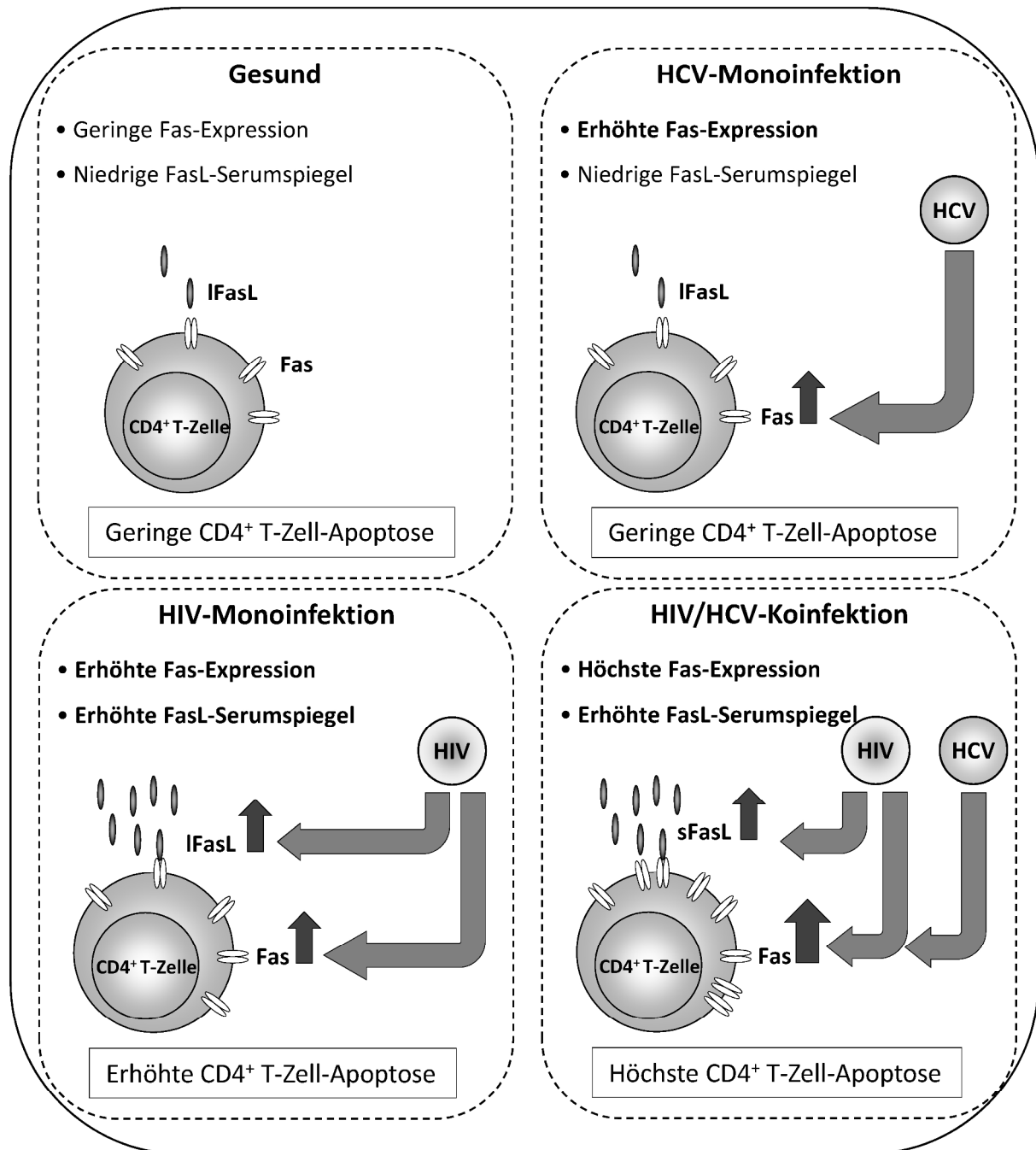
Vergleich zu HCV-negativen Individuen unveränderte Apoptoserate bei HCV-positiven Patienten könnten die in unserer Studie gemessenen nicht erhöhten Serumspiegel des FasL sein. Im Gegensatz zu Patienten mit einer HIV-Infektion verblieb die mittlere Serumkonzentration wie auch die Expression von membranösem FasL nahezu unverändert. Während Toyoda *et al.* sogar niedrigere FasL-Serumspiegel in Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion feststellten<sup>168</sup>, wurde in einer anderen Studie jedoch erhöhte Konzentrationen des löslichen FasL im Serum gemessen<sup>169</sup>.

Die signifikante Assoziation einer verstärkten Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl mit einer HIV- als auch mit einer HCV-Monoinfektion ließen vermuten, dass in HIV/HCV-koinfizierten Patienten eine HIV- und HCV-induzierte additive Hochregulation des Fas-Rezeptors bestehen könnte. In der Tat wurde bei unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Mittel die höchste Expression des Rezeptors auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden. In diesem Zusammenhang konnte nach Inkubation mit rhFasL ebenfalls eine signifikant erhöhte Apoptoserate von T-Helferzellen festgestellt werden, sowohl im Vergleich mit HIV-monoinfizierten als auch im Vergleich mit HCV-monoinfizierten Patienten. Im Gegensatz dazu führte eine HCV-Koinfektion nicht zu einer verstärkten Expression und Sekretion des FasL in Patienten mit einer HIV-Infektion. Diese Beobachtung steht damit auch in Übereinstimmung mit Beobachtungen, die im Vergleich mit gesunden Probanden und HCV-monoinfizierten Patienten gemacht wurden. Bei der Gegenüberstellung dieser beiden Gruppen ist ein Einfluss der HCV-Infektion auf die Sekretion und Expression des Fas-Liganden ebenfalls nicht zu erkennen.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen stark daraufhin, dass die HIV- und HCV-induzierte additive Hochregulation des Fas-Rezeptors in Kombination mit der HIV-induzierten Erhöhung der Sekretion des FasL einen synergistischen Mechanismus darstellt, der die im Vergleich zur HIV-Monoinfektion hohe CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion erklären könnte (Abbildung 5.1).

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass eine erhöhte Fas-Expression und Apoptoserate auch bei Hepatozyten von HIV/HCV-koinfizierten Patienten beobachtet wurde, welche möglicherweise durch synergistische Interaktionen zwischen HIV- und HCV-Hüllproteinen ausgelöst worden sein könnten<sup>149,170,171</sup>.

Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen der Regulation des Fas/FasL-Systems noch nicht eindeutig identifiziert worden sind<sup>172</sup>, gibt es einige Hinweise auf mögliche Ursachen, die die Veränderungen in der Fas-vermittelten Apoptose bei HIV-, HCV- und HIV/HCV-infizierten Patienten erklären könnten.



**Abb. 5.1: Vereinfachtes Modell der Fas-vermittelten Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion.**

Die Grafik fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit und vorangegangener Studien in einem vereinfachten Modell zusammen, um die unterschiedlichen Effekte von HIV und HCV auf den Fas/FasL-Signalweg zu erklären. Das Modell veranschaulicht dabei wie bei einer HIV/HCV-Koinfektion die HIV- und HCV-induzierten Veränderungen in einem synergistischen Mechanismus resultieren, der die beobachtete Sensitivität gegenüber einer FasL-induzierten Apoptose *in vitro* (durch erhöhte Expression von Fas) und die hohe Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* erklärt.

So wurde vermutet, dass das Interleukin 7 (IL-7) eine Rolle bei der Hochregulation von Fas spielt, da exogenes IL-7 Fas-vermittelte Apoptose induziert und erhöhte Spiegel von IL-7 im Serum von HIV-positiven Individuen gemessen worden sind<sup>173,174,175</sup>. IL-7 wurde allerdings auch eine Rolle bei der T-Zell-Differenzierung und -Proliferation zugeschrieben, so dass es sich bei der vermehrten Produktion

von IL-7 möglicherweise um einen Feedback-Mechanismus handelt, der im Zuge der fortschreitenden HIV-Infektion die T-Zell-Homöostase aufrecht erhalten soll<sup>176</sup>. Die Analysen der IL-7 Serumspiegel in HIV/HCV-koinfizierten Patienten durch Cianci *et al.* und Soriano-Sarabia *et al.* zeigten jedoch keine Erhöhung der IL-7-Spiegel im Serum von HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion<sup>142,132</sup>.

Auch direkte Interaktionen zwischen HIV und T-Helferzellen können die Fas-Expression und die Signalübertragung zwischen Fas und FasL beeinflussen und somit die Sensitivität gegenüber FasL-induzierter Apoptose erhöhen. So begünstigt das HIV-Glykoprotein gp120 Fas-vermittelte Apoptose durch die Interaktion mit dem CD4-Rezeptor und der anschließenden Assoziation mit phosphoryliertem Ezrin<sup>119</sup>. Des Weiteren wurde von einer erhöhten Empfindlichkeit von T-Helferzellen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose im Zusammenhang mit dem HIV-1-Protein Tat berichtet<sup>118</sup>. Li-Weber *et al.* zeigten, dass Tat zusätzlich auch die Expression von FasL auf T-Zellen erhöht<sup>177</sup>.

Auch HCV-Proteine können direkt in die intrazellulären Signalwege der Apoptose in infizierten Zellen eingreifen, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von Apoptose führen kann.<sup>152</sup> Inwieweit sich PBMC oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen von HCV infizieren lassen bzw. ein Reservoir für HCV darstellen, ist allerdings umstritten. Während einige Studien HCV-RNA in PBMC von HCV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten nachweisen konnten<sup>61,178,179</sup>, vermuteten Natarajan *et al.*, dass diese Beobachtungen nicht auf einer aktiven Replikation in den Zellen beruhten, sondern vielmehr auf der Anhaftung von HCV-Virionen auf der Zelloberfläche<sup>62</sup>.

Veränderungen im Zusammenhang mit einer HIV- bzw. HCV-Infektion wurden auch bei der TRAIL-induzierten Apoptose und den Signal-translozierenden Rezeptoren DR4 und DR5 beobachtet<sup>180,181,182,183</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten wir feststellen, dass eine HIV-Infektion bei monoinfizierten und HCV-koinfizierten Patienten mit einem erhöhten Serumspiegel von löslichem TRAIL verbunden war. Des Weiteren zeigte eine Korrelationsanalyse in beiden Patientengruppen einen signifikanten Zusammenhang zwischen TRAIL-Konzentration und HIV-Last. Die Ergebnisse stimmten im Fall der HIV-Monoinfektion mit den Beobachtungen von Herbeuval *et al.* und Gibellini *et al.* überein, die ebenfalls eine positive Korrelation zwischen TRAIL-Serumspiegeln und HIV-Last fanden<sup>180,181</sup>. *In vitro* Experimente lassen vermuten, dass lösliches TRAIL nach Inkubation mit HIV-1 oder Exposition mit dem HIV-Protein Tat vor allem von Monozyten und dendritischen Zellen sezerniert wird<sup>182,117</sup>. Auch die Expression der membranständigen Form von TRAIL war in unseren Untersuchungen erhöht. Herbeuval *et al.* konnten *in vitro* ebenfalls eine Erhöhung der TRAIL-Expression nachweisen und lieferten Hinweise, dass diese IFN- $\alpha$ -induziert war<sup>183</sup>. In einer weiteren Studie konnten sie HIV-1 stimulierte plasmazytoide dendritische Zellen als Produzenten des IFN- $\alpha$  identifizieren<sup>184</sup>.

Bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion blieb die TRAIL-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen jedoch normal und auch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten konnte kein Einfluss von HCV auf die Oberflächenexpression gefunden werden. Dagegen wurde ein Effekt von HCV auf die Serumspiegel löslichen TRAILs gefunden. Eine HCV-Infektion war im Vergleich mit HIV-negativen und HIV-positiven Patientengruppen jeweils mit einer Erhöhung der TRAIL-Konzentration verbunden. Aufgrund der niedrigen Fallzahl erreichten die Unterschiede jedoch nicht statistische Signifikanz.

Im Gegensatz zu TRAIL konnte in unseren Untersuchungen kein signifikanter Effekt der HIV-Infektion oder HCV-Infektion auf die Expression der korrespondierenden Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass DR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen praktisch nicht exprimiert wurde und nur einer geringer Prozentsatz DR4 auf der Oberfläche trug. Ein pro-apoptotischer Effekt auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch TRAIL-induzierte Apoptose konnte daher nach unseren Beobachtungen bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion ausgeschlossen werden. In einer anderen Studie konnte allerdings eine erhöhte Expression von DR5 auf T-Helferzellen von HIV-positiven Patienten beobachtet werden<sup>183</sup>.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen und der Deutung der vorliegenden Literatur ist ein additiver oder synergistischer Effekt der HCV-Koinfektion auf das TRAIL-System gering. Mögliche Auswirkungen auf die Apoptoserate von T-Helferzellen von Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion *in vivo* konnten daher nicht nachgewiesen werden.

Die eminente Rolle der TRAIL-vermittelten Apoptose bei der Elimination von Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen ist hinreichend belegt<sup>185,186,187,188</sup>. Mehrere Studien konnten eine Bedeutung bei der Kontrolle der HIV-Infektion und der HCV-Infektion feststellen<sup>151,189 190,191,192</sup>. Im Vergleich zu den umfassenden Veränderungen im Fas-System scheint die TRAIL-induzierte Apoptose jedoch eher einen untergeordneten Beitrag zur hohen Apoptoserate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten zu leisten.

### 5.2.3 Einfluss der cART auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion

Der enorme Nutzen der antiretroviralen Kombinationstherapie (cART) konnte seit der Einführung Mitte der neunziger Jahre wiederholt bestätigt werden. Die effektive Suppression der HIV-Replikation im Rahmen der cART senkt die Viruslast langfristig unter die derzeit gültige Nachweisgrenze von 40 Kopien/ml. Dies korreliert mit dem Absinken der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate und einer Erholung der T-Helferzell-Zahl<sup>193,194</sup>, welche schließlich in einer verringerten Mortalität und einer gesteigerten Lebenserwartung resultiert<sup>195,196,197,198</sup>. Weiterhin konnte bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit einer erfolgreichen Immunrestitution unter cART eine verlangsamte Progression der Fibrose und eine reduzierte leberbezogene Mortalität festgestellt werden.<sup>88</sup>

Bezüglich der HIV-Monoinfektion standen unsere Ergebnisse im Einklang mit früheren Beobachtungen anderer Autoren. Die Ergebnisse unserer Querschnittsuntersuchungen sowie die longitudinale Untersuchung von HIV-positiven Patienten nach Einleitung einer cART stellten nochmals die signifikante Assoziation zwischen der Suppression der HIV-Replikation, der verringerten Apoptoserate und dem Anstieg der T-Helferzell-Zahl heraus. Besonders deutlich wird dieses an der biphasischen Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate, welche bereits im Zusammenhang mit der HIV-Replikation und der Immunrekonstitution beobachtet worden war<sup>199,200</sup>.

Analog zur HIV-monoinfizierten Patientengruppe konnte bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion eine ähnliche Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose unter cART beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Abnahme der Apoptoserate bei HIV/HCV-Koinfektion im Vergleich zu Patienten mit einer HIV-Monoinfektion stärker war. Der bei unbehandelten Patienten beobachtete stärkere Effekt der HCV-Koinfektion auf die T-Helferzell-Apoptose konnte allerdings bei Patienten unter einer effektiven cART nicht mehr festgestellt werden.

Obwohl zwischen den HIV-positiven Patientengruppen unter cART bezüglich der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose kein Unterschied mehr bestand, lag die residuale Apoptoserate immer noch über der, die bei gesunden Probanden beobachtet worden war. Mehrere Studien konnten ebenfalls beobachten, dass trotz langfristiger und anhaltender Inhibition der viralen Replikation, eine gänzliche Normalisierung der Apoptose bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit einer HIV-Monoinfektion ausblieb<sup>193,201</sup>.

Als mögliche Ursache kommt auf der einen Seite eine weiterhin bestehende HIV-Replikation unterhalb der Detektionsgrenze in Betracht<sup>202,203,204</sup>. Auf der anderen Seite könnte die residuale Apoptose auch indirekte Mechanismen, wie z.B. eine weiterhin bestehende Immunaktivierung als Folge der chronischen HIV-Infektion, widerspiegeln. Obwohl mehrere Studien eine Reduktion von HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD38<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer effektiven Kombinationstherapie beobachteten<sup>205,206,207,208</sup>, kann eine residuale Aktivierung des Immunsystems in Folge einer rezidiven HIV-Replikation nicht ausgeschlossen werden<sup>209,210</sup>. Auch könnten nachteilige Effekte der antiretroviralen Kombinationstherapie als Erklärung herangezogen werden.

In diesem Zusammenhang stellten wir fest, dass die residuale Apoptose bei Patienten, die mit einem Protease-Inhibitor (PI) behandelt worden sind, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe oder Patienten ohne PI-basierte cART signifikant erhöht war. Obwohl PIs die zelluläre Apoptose auf der Ebene der mitochondrialen Poren-Proteine blockieren<sup>211</sup>, wurden in *in vitro* Experimenten pro-apoptotische Effekte in hämatologischen und Tumor-Zelllinien beobachtet<sup>212,213</sup>. Neben weiteren Studien, die PIs eine anti-apoptotische Wirkung zuschrieben<sup>214</sup>, zeigten andere Arbeiten vor allem in höheren Dosen pro-apoptotische Effekte, z.B. auf die Expression von Proteinen, die im Zusammenhang mit der apoptotischen Signalkaskade stehen<sup>215,216</sup>. Aber auch Apoptose-induzierende

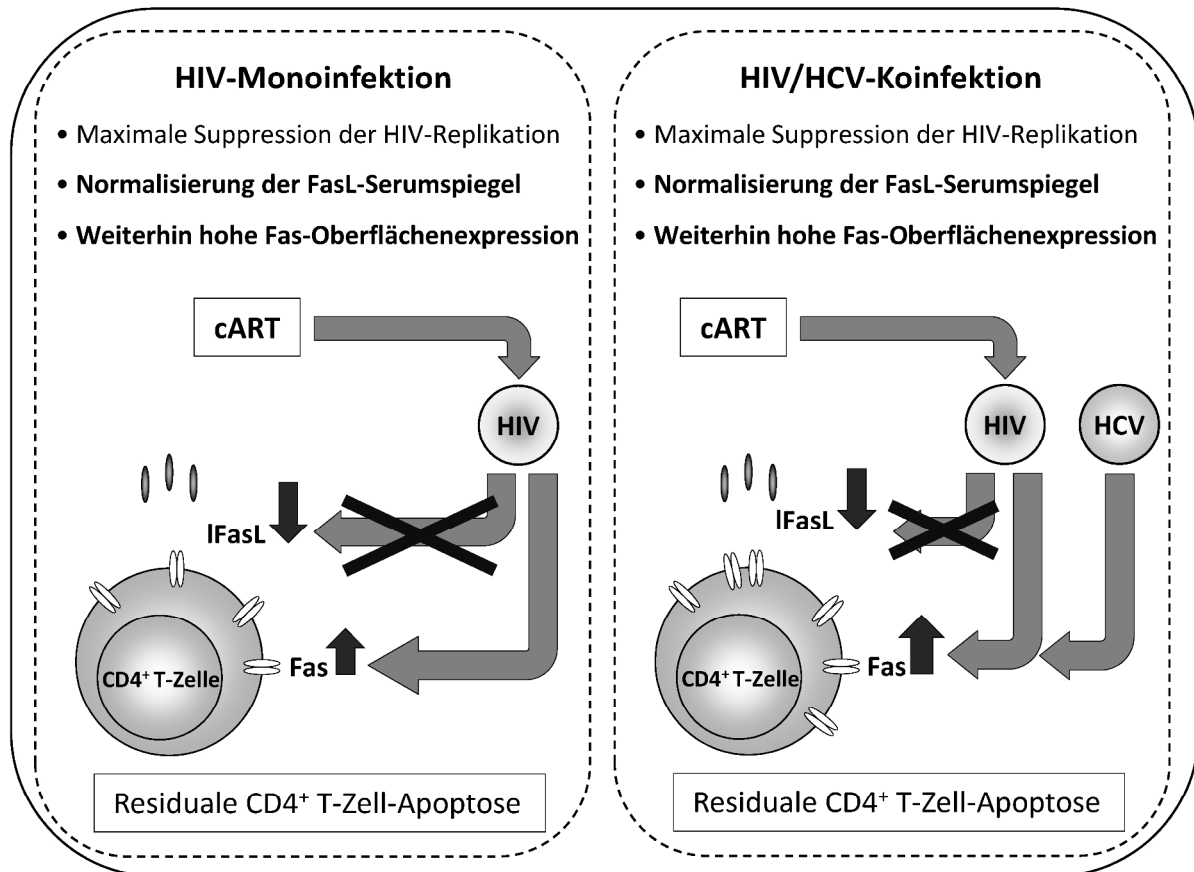
Wirkungen von Lamivudin und Zidovudin, zwei Substanzen der Gruppe der NRTI, wurden beobachtet<sup>217,218</sup>.

Unabhängig von möglichen pro-apoptotischen Nebenwirkungen antiretroviraler Medikamente wurde untersucht, inwieweit sich die beobachtete Reduktion der Apoptoserate nach der Initiation einer cART und die residuale Apoptoserate bei Patienten mit konsistenter Suppression der HIV-Replikation mit Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Apoptose erklären lässt.

Bezüglich der Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der damit verbundenen Empfindlichkeit gegenüber Fas-vermittelter Apoptose wurden bislang unterschiedliche Beobachtungen gemacht: Während einige Autoren eine signifikante Reduktion der Fas-Expression bei PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Zuge einer effektiven cART feststellten<sup>219,220,221</sup>, zeigten Wasmuth *et al.* und de Oliveira *et al.*, dass im Vergleich zu HIV-negativen Probanden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-positiven Patienten weiterhin vermehrt Fas exprimieren und in Anwesenheit von anti-CD95 verstärkt Apoptose induziert wird<sup>201,217</sup>.

Letztere Befunde stehen somit im Einklang mit unseren Beobachtungen, in denen trotz einer konsistent nicht nachweisbaren HIV-Last eine erhöhte Oberflächendichte des Fas-Rezeptors und eine stärkere Sensitivität von T-Helferzellen gegenüber FasL-induzierter Apoptose festgestellt werden konnte. Trotz einer Abnahme im Vergleich zu virämischen HIV-positiven Patienten war die Fas-Expression bei HIV-monoinfizierten wie auch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht. Der Vergleich der beiden HIV-infizierten Patientengruppen mit nicht-nachweisbarer HIV-RNA lässt zudem vermuten, dass eine effektive antiretrovirale Therapie nur einen eingeschränkten Einfluss auf die HCV-induzierte Fas-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzt. Die Oberflächendichte des Fas-Rezeptors war demnach bei behandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten im Vergleich zur HIV-monoinfizierten Patientengruppe weiterhin signifikant erhöht. Dies zeigt, dass die derzeitige antiretrovirale Therapie nur partiell in der Lage war, die HIV-assoziierte Dysfunktion des Immunsystems rückgängig zu machen.

Dem gegenüber stand jedoch eine Normalisierung des korrespondierenden Liganden bei HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten, die mit einer effektiven cART behandelt wurden. Die Reduktion der zellulären Expression und der Serumspiegel des Fas-Liganden in beiden HIV-infizierten Patientengruppen stellt mit großer Wahrscheinlichkeit einen der Mechanismen dar, die der Abnahme der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose zugrunde liegen. Die Normalisierung des FasL hätte damit einen wichtigen Anteil an der Wiederherstellung der Immunfunktion unter einer effektiven antiretroviralen Therapie<sup>222,223</sup>. Weiterhin könnte dieser Effekt auch die ähnlichen Apoptoseraten von T-Helferzellen bei HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten mit nicht-nachweisbarer HIV-RNA erklären: Trotz weiterhin erhöhter Sensitivität gegenüber FasL-induzierter Apoptose nimmt durch die Normalisierung des FasL die Wahrscheinlichkeit eines extrinsischen Stimulus über den Fas-Rezeptor ab (Abbildung 5.2).



**Abb. 5.2: Einfluss der cART auf die Fas-vermittelte Apoptose bei HIV- und HIV/HCV-Koinfektion.**

Die Grafik stellt die beobachteten HAART-assoziierten Effekte auf die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose modellhaft dar. Eine effektive cART ist mit einer Normalisierung des löslichen Fas-Liganden in HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten assoziiert. Dagegen konnte keine signifikante Reduktion der Fas-Expression auf T-Helferzellen beobachtet werden. Dennoch ist eine effektive antiretrovirale Therapie mit einer signifikanten Reduktion der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptose assoziiert, die jedoch nicht das Niveau von gesunden Kontrollen erreicht.

Analog zum FasL war eine effektive HAART auch mit einer signifikanten Reduktion der TRAIL-Serumspiegel assoziiert, sowohl bei HIV-monoinfizierten als auch bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten. Eine vollständige Normalisierung der TRAIL-Konzentrationen im Serum konnte jedoch nicht erreicht werden und deckt sich damit mit den Beobachtungen von Herbeval *et al*<sup>117,223</sup>. In unseren Untersuchungen war praktisch keine Expression der TRAIL-Rezeptoren auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar. Infolgedessen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten, sowie HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten bzgl. der TRAIL-Rezeptoren gefunden werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich auch bei Patienten mit einer effektiven antiretroviralen Therapie die gemessenen Apoptoseraten bei HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten durch die cART-assoziierten Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Apoptose erklären lassen. Auch hier scheint das Fas-System im Vergleich zur TRAIL-vermittelten Apoptose eine hervorgehobene Rolle einzunehmen. Darüber hinaus sind jedoch auch Fas/FasL-unabhängige

Mechanismen als Erklärung für die residuale Apoptoserate in den behandelten Patientengruppen nicht auszuschließen<sup>224,225</sup>.

### 5.3 Zusammenfassende Beurteilung des Einflusses der HCV-Koinfektion auf die HIV-Progression

Der Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Progression der HIV-Infektion sowie auf die Immunrekonstitution wird immer noch kontrovers diskutiert. Diese Arbeit sollte daher den Zelltod und die Neubildungsrate von T-Helferzellen als zwei wichtige Mechanismen der T-Zell-Homöostase, bei Patienten mit einer HIV/HCV-Koinfektion näher beleuchten.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse daraufhin, dass eine HCV-Koinfektion mit einem beschleunigten Verlauf der HIV-Infektion bei unbehandelten Patienten assoziiert sein könnte. Besonders die hohe Apoptoserate von T-Helferzellen könnte eine Erklärung für den verstärkten Verlust von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei unbehandelten HIV/HCV-koinfizierten Patienten sein, der von Carlos Martin *et al.* beobachtet worden war<sup>89</sup>. Überdies liefern unsere Ergebnisse starke Hinweise auf eine synergistische Interaktion von HIV und HCV auf die Fas/FasL-vermittelte Induktion von Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und unterstreichen damit die bedeutende Rolle des Fas-Systems in der Pathogenese der HIV- und HCV-Infektion und im Besonderen in der HIV/HCV-Koinfektion.

Ob eine verminderte Produktion des Thymus Anteil an dem schlechteren immunologischen Verlauf der HIV-Infektion bei Patienten mit einer HCV-Koinfektion hat, ist nach unseren Ergebnissen und der vorhandenen Literatur schwer zu beantworten, letztendlich jedoch eher zu verneinen.

Ein negativer Einfluss der HCV-Koinfektion auf die Immunrekonstitution im Rahmen einer effektiven antiretroviralen Therapie wurde ebenfalls diskutiert<sup>226,227,228</sup>. Neuere Studien an größeren Kohorten konnten jedoch keinen Unterschied mehr im Anstieg der T-Helferzell-Zahl zwischen HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten finden<sup>1,229,230</sup>. Unsere Ergebnisse helfen die widersprüchlichen klinischen Daten bezüglich der HIV-Progression bei Patienten mit einer HCV-Koinfektion zu erklären. In unserer Vergleichsstudie konnte ein negativer Effekt der HCV-Koinfektion nur bei unbehandelten Patienten festgestellt werden, während sich die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Apoptoseraten von HIV-monoinfizierten und HIV/HCV-koinfizierten Patienten bereits kurz nach der Einleitung einer cART angleichen.

Vor diesem Hintergrund ist eine frühe Initiation einer antiretroviralen Therapie bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten nicht nur ein Weg zur Reduktion der Leber-assoziierten Mortalität<sup>231</sup>, sondern auch eine effektive Maßnahme, um einem exzessiven Verlust von T-Helferzellen in Patienten mit HIV/HCV-Koinfektion vorzubeugen.



## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Rockstroh, J.K. u. a. Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis* **192**, 992-1002 (2005).
2. Lewden, C. u. a. Changes in causes of death among adults infected by HIV between 2000 and 2005: The „Mortalité 2000 and 2005“ surveys (ANRS EN19 and Mortavic). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **48**, 590-598 (2008).
3. Lewden, C. u. a. Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. *Int J Epidemiol* **34**, 121-130 (2005).
4. Barré-Sinoussi, F. u. a. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
5. Pneumocystis Pneumonia -- Los Angeles. *CDC-MMWR* 250-2 (1981).
6. Clavel, F. u. a. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346 (1986).
7. Robertson, D.L. u. a. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56 (2000).
8. Kuiken, C. u. a. *HIV Sequence Compendium 2010*. (Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 10-03684: ).
9. Sharp, P.M. & Hahn, B.H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* **365**, 2487-2494 (2010).
10. Gao, F. u. a. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-441 (1999).
11. Keele, B.F. u. a. Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* **460**, 515-519 (2009).
12. Daniel, M.D. u. a. Simian models for AIDS. *Cancer Detect Prev Suppl* **1**, 501-507 (1987).
13. *Report on the global AIDS epidemic 2010*. (UNAIDS: 2010).
14. de Silva, T.I., Cotten, M. & Rowland-Jones, S.L. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* **16**, 588-595 (2008).
15. Reeves, J.D. & Doms, R.W. Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol* **83**, 1253-1265 (2002).
16. Remy HIV-2 infection throughout the world. A geographical perspective. *Sante* **8**, 440-446 (1998).
17. Robert-Koch Institut Epidemiologisches Bulletin. (2010).
18. UNAIDS The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. (2011).
19. Shepard, R.N. u. a. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in different biological compartments. *J. Clin. Microbiol* **38**, 1414-1418 (2000).
20. *HIV 2010*. (Medizin Fokus Verlag: ).
21. Vittinghoff, E. u. a. Per-contact risk of human immunodeficiency virus transmission between male sexual partners. *Am. J. Epidemiol* **150**, 306-311 (1999).
22. Dalgleish, A.G. u. a. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767 (1984).
23. Klatzmann, D. u. a. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768 (1984).
24. Brechley, J.M. & Douek, D.C. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* **1**, 23-30 (2008).
25. Hecht, F.M. u. a. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* **16**, 1119-1129 (2002).
26. Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A.S. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med* **328**, 327-335 (1993).
27. Lifson, A.R., Rutherford, G.W. & Jaffe, H.W. The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis* **158**, 1360-1367 (1988).
28. Muñoz, A. u. a. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am. J. Epidemiol* **130**, 530-539 (1989).
29. O'Brien, T.R. u. a. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA* **276**, 105-110 (1996).

30. Guyader, M. u. a. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**, 662-669 (1987).
31. NIAID Structure of HIV: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/Pages/structure.aspx>. (2011).
32. Deng, H. u. a. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666 (1996).
33. Doranz, B.J. u. a. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158 (1996).
34. Dragic, T. u. a. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673 (1996).
35. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
36. Doranz, B.J., Berson, J.F., Rucker, J. & Doms, R.W. Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol. Res* **16**, 15-28 (1997).
37. Arhel, N.J. u. a. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* **26**, 3025-3037 (2007).
38. Siliciano, J.D. u. a. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med* **9**, 727-728 (2003).
39. Brinkman, K., Smeitink, J.A., Romijn, J.A. & Reiss, P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* **354**, 1112-1115 (1999).
40. Kempf, D.J. u. a. Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob. Agents Chemother* **41**, 654-660 (1997).
41. Choo, Q.L. u. a. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362 (1989).
42. Choo, Q.L. u. a. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull* **46**, 423-441 (1990).
43. Choo, Q.L. u. a. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 2451-2455 (1991).
44. Simmonds, P. u. a. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J. Gen. Virol* **75 ( Pt 5)**, 1053-1061 (1994).
45. Simmonds, P. u. a. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962-973 (2005).
46. Alter, M.J. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* **26**, 62S-65S (1997).
47. Fallahian, F. & Najafi, A. Epidemiology of hepatitis C in the Middle East. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **22**, 1-9 (2011).
48. Lee, C.-M., Hung, C.-H., Lu, S.-N. & Changchien, C.-S. Hepatitis C virus genotypes: clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med J* **31**, 16-25 (2008).
49. Alter, H.J. u. a. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med* **321**, 1494-1500 (1989).
50. François, M. u. a. Prevalence and significance of hepatitis C virus (HCV) viremia in HCV antibody-positive subjects from various populations. *J. Clin. Microbiol* **31**, 1189-1193 (1993).
51. *Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben*. BGBl. I S. 2631 (1997).
52. Meisel, H. u. a. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* **345**, 1209-1211 (1995).
53. Power, J.P. u. a. Molecular epidemiology of an outbreak of infection with hepatitis C virus in recipients of anti-D immunoglobulin. *Lancet* **345**, 1211-1213 (1995).
54. Poynard, T., Bedossa, P. & Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **349**, 825-832 (1997).
55. Di Bisceglie, A.M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **26**, 34S-38S (1997).
56. Montalbano, M. & Neff, G.W. An update in liver transplantation in patients with hepatitis B and hepatitis C. *Minerva Gastroenterol Dietol* **51**, 109-126 (2005).
57. Yu, X. u. a. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* **367**, 126-134 (2007).
58. Sakai, A. u. a. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 11646-11651 (2003).
59. Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res* **63**, 71-180 (2004).

60. Blackard, J.T., Kemmer, N. & Sherman, K.E. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* **44**, 15-22 (2006).
61. Laskus, T. u. a. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *J. Infect. Dis* **195**, 124-133 (2007).
62. Natarajan, V. u. a. HCV in peripheral blood mononuclear cells are predominantly carried on the surface of cells in HIV/HCV co-infected individuals. *J. Med. Virol* **82**, 2032-2037 (2010).
63. Pileri, P. u. a. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941 (1998).
64. Scarselli, E. u. a. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**, 5017-5025 (2002).
65. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. & Zhang, Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 12766-12771 (1999).
66. Evans, M.J. u. a. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-805 (2007).
67. Ploss, A. u. a. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882-886 (2009).
68. Blanchard, E. u. a. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol* **80**, 6964-6972 (2006).
69. Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol* **80**, 11571-11578 (2006).
70. Egger, D. u. a. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol* **76**, 5974-5984 (2002).
71. Moradpour, D. u. a. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* **60**, 103-109 (2003).
72. McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G. & Martoglio, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980-3988 (2002).
73. Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* **19**, 95-103 (2011).
74. Fried, M.W. u. a. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med* **347**, 975-982 (2002).
75. Manns, M.P. u. a. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958-965 (2001).
76. Wyles, D.L. Moving beyond interferon alfa: investigational drugs for hepatitis C virus infection. *Top HIV Med* **18**, 132-136 (2010).
77. Soriano, V., Vispo, E., Labarga, P., Medrano, J. & Barreiro, P. Viral hepatitis and HIV co-infection. *Antiviral Res* **85**, 303-315 (2010).
78. Eyster, M.E. u. a. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **6**, 602-610 (1993).
79. Rodríguez-Méndez, M.L., González-Quintela, A., Aguilera, A., Carballo, E. & Barrio, E. Association of HCV and HBV markers in Spanish HIV-seropositive patients in relation to risk practices. *Hepatogastroenterology* **50**, 2093-2097 (2003).
80. Bottieau, E., Apers, L., Van Esbroeck, M., Vandenbrouaene, M. & Florence, E. Hepatitis C virus infection in HIV-infected men who have sex with men: sustained rising incidence in Antwerp, Belgium, 2001-2009. *Euro Surveill* **15**, 19673 (2010).
81. Barfod, T.S., Omland, L.H. & Katzenstein, T.L. Incidence and characteristics of sexually transmitted acute hepatitis C virus infection among HIV-positive men who have sex with men in Copenhagen, Denmark during four years (2006-2009): a retrospective cohort study. *Scand. J. Infect. Dis* **43**, 145-148 (2011).
82. Urbanus, A.T. u. a. Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: an expanding epidemic. *AIDS* **23**, F1-7 (2009).
83. Schmidt, A.J. u. a. Trouble with Bleeding: Risk Factors for Acute Hepatitis C among HIV-Positive Gay Men from Germany-A Case-Control Study. *PLoS ONE* **6**, e17781 (2011).
84. Danta, M. u. a. Impact of HIV on host-virus interactions during early hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis* **197**, 1558-1566 (2008).
85. Soto, B. u. a. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J. Hepatol* **26**, 1-5 (1997).
86. Giordano, T.P., Kramer, J.R., Soucek, J., Richardson, P. & El-Serag, H.B. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HIV-infected veterans with and without the hepatitis C virus: a cohort study, 1992-2001. *Arch. Intern. Med* **164**, 2349-2354 (2004).

87. Bräu, N. u. a. Slower fibrosis progression in HIV/HCV-coinfected patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. *J. Hepatol* **44**, 47-55 (2006).
88. Qurishi, N. u. a. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet* **362**, 1708-1713 (2003).
89. Carlos Martín, J. u. a. Impact of chronic hepatitis C on HIV-1 disease progression. *HIV Clin Trials* **5**, 125-131 (2004).
90. Greub, G. u. a. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* **356**, 1800-1805 (2000).
91. Kaufmann, G.R. u. a. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch. Intern. Med* **163**, 2187-2195 (2003).
92. Peters, L. u. a. Hepatitis C virus coinfection does not influence the CD4 cell recovery in HIV-1-infected patients with maximum virologic suppression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **50**, 457-463 (2009).
93. Harper, M.E., Marselle, L.M., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **83**, 772-776 (1986).
94. Psallidopoulos, M.C. u. a. Integrated proviral human immunodeficiency virus type 1 is present in CD4+ peripheral blood lymphocytes in healthy seropositive individuals. *J. Virol* **63**, 4626-4631 (1989).
95. Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J. & Marrack, P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol* **19**, 516-521 (2007).
96. Takeshita, S., Toda, M. & Yamagishi, H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J* **8**, 3261-3270 (1989).
97. Livak, F. & Schatz, D.G. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol. Cell. Biol* **16**, 609-618 (1996).
98. Kong, F., Chen, C.H. & Cooper, M.D. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* **8**, 97-104 (1998).
99. Douek, D.C. u. a. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* **396**, 690-695 (1998).
100. Steffens, C.M. u. a. T cell receptor excision circle (TREC) content following maximum HIV suppression is equivalent in HIV-infected and HIV-uninfected individuals. *AIDS* **15**, 1757-1764 (2001).
101. Franco, J.M. u. a. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* **99**, 3702-3706 (2002).
102. Pekovic, D.D. u. a. Pathogenicity of HIV in lymphatic organs of patients with AIDS. *J. Pathol* **152**, 31-35 (1987).
103. Hatzakis, A. u. a. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet* **355**, 599-604 (2000).
104. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).
105. Pope, R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol* **2**, 527-535 (2002).
106. Ameisen, J.C. & Capron, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* **12**, 102-105 (1991).
107. Gougeon, M.L. u. a. [Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients]. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* **312**, 529-537 (1991).
108. Groux, H., Monte, D., Bourrez, J.M., Capron, A. & Ameisen, J.C. [Activation of CD4+ T-lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induce the program action of lymphocyte death by apoptosis]. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* **312**, 599-606 (1991).
109. Laurent-Crawford, A.G. u. a. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* **185**, 829-839 (1991).
110. Terai, C., Kornbluth, R.S., Pauza, C.D., Richman, D.D. & Carson, D.A. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest* **87**, 1710-1715 (1991).
111. Gougeon, M.L. T cell apoptosis as a consequence of chronic activation of the immune system in HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol* **374**, 121-127 (1995).
112. Varbanov, M., Espert, L. & Biard-Piechaczyk, M. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Rev* **8**, 221-236 (2006).
113. Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V. & Pardee, A.B. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**, 429-431 (1995).
114. Purvis, S.F., Jacobberger, J.W., Sramkoski, R.M., Patki, A.H. & Lederman, M.M. HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 443-450 (1995).

115. Lu, Y.Y. u. a. Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* **68**, 390-399 (1994).
116. Laurent-Crawford, A.G. u. a. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 761-773 (1993).
117. Herbeuval, J.-P. u. a. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* **105**, 2458-2464 (2005).
118. Westendorp, M.O. u. a. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**, 497-500 (1995).
119. Luciani, F. u. a. CD95/phosphorylated ezrin association underlies HIV-1 GP120/IL-2-induced susceptibility to CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis of human resting CD4(+)T lymphocytes. *Cell Death Differ* **11**, 574-582 (2004).
120. Poonia, B., Pauza, C.D. & Salvato, M.S. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. *Retrovirology* **6**, 91 (2009).
121. Böyum, A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl* **97**, 9-29 (1968).
122. BD Biosciences Technical Data Sheet APO-DIRECT™ Kit.
123. De Rossi, A. u. a. In vitro studies of HIV-1 infection in thymic lymphocytes: a putative role of the thymus in AIDS pathogenesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**, 287-298 (1990).
124. Haynes u. a. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest* **103**, 921 (1999).
125. Grody, W.W., Fligiel, S. & Naeim, F. Thymus involution in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Clin. Pathol* **84**, 85-95 (1985).
126. Nobile, M. u. a. De novo T-cell generation in patients at different ages and stages of HIV-1 disease. *Blood* **104**, 470-477 (2004).
127. Douek, D.C. u. a. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol* **167**, 6663-6668 (2001).
128. Richardson, M.W. u. a. Analysis of telomere length and thymic output in fast and slow/non-progressors with HIV infection. *Biomed. Pharmacother* **54**, 21-31 (2000).
129. Chattopadhyay, P.K. u. a. Longitudinal assessment of de novo T cell production in relation to HIV-associated T cell homeostasis failure. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 501-507 (2006).
130. Dion, M.-L. u. a. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* **21**, 757-768 (2004).
131. Zhang, L. u. a. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J. Exp. Med* **190**, 725-732 (1999).
132. Soriano-Sarabia, N. u. a. HIV-hepatitis C virus co-infection is associated with decreased plasmatic IL-7 levels. *AIDS* **21**, 253-255 (2007).
133. Cianci, R. u. a. Impairment of recent thymic emigrants in HCV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**, 723-728 (2005).
134. Correa, R. & Muñoz-Fernández, A. Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *AIDS* **16**, 1181-1183 (2002).
135. De Rossi, A. u. a. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 Trial. *J. Infect. Dis* **186**, 312-320 (2002).
136. Lewin, S.R. u. a. Dynamics of T cells and TCR excision circles differ after treatment of acute and chronic HIV infection. *J. Immunol* **169**, 4657-4666 (2002).
137. Kolte, L. u. a. Association between larger thymic size and higher thymic output in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis* **185**, 1578-1585 (2002).
138. Hazenberg, M.D. u. a. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat. Med* **6**, 1036-1042 (2000).
139. Hazenberg, M.D. u. a. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* **95**, 249-255 (2000).
140. Meyaard, L. u. a. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* **257**, 217-219 (1992).
141. Ye, P. & Kirschner, D.E. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J. Immunol* **168**, 4968-4979 (2002).
142. Cianci, R., De Luca, A., Cammarota, G., Cauda, R. & Pandolfi, F. HCV co-infection does not affect the TREC/IL-7 pathway in HIV disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **12**, 67-69 (2008).

143. Samuelsson, A., Broström, C., van Dijk, N., Sönnernborg, A. & Chiodi, F. Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection--correlation with clinical progression, viral load, and loss of humoral immunity. *Virology* **238**, 180-188 (1997).
144. Núñez, M. u. a. Coinfection with hepatitis C virus increases lymphocyte apoptosis in HIV-infected patients. *Clin. Infect. Dis* **43**, 1209-1212 (2006).
145. Fadok, V.A. u. a. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol* **148**, 2207-2216 (1992).
146. Gougeon, M.L. u. a. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol* **156**, 3509-3520 (1996).
147. Benito, J.M. u. a. Differences in cellular activation and apoptosis in HIV-infected patients receiving protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 1379-1388 (2002).
148. Douek, D.C. u. a. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**, 95-98 (2002).
149. Munshi, N., Balasubramanian, A., Koziel, M., Ganju, R.K. & Groopman, J.E. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. *J. Infect. Dis* **188**, 1192-1204 (2003).
150. Laurent-Crawford, A.G., Coccia, E., Krust, B. & Hovanessian, A.G. Membrane-expressed HIV envelope glycoprotein heterodimer is a powerful inducer of cell death in uninfected CD4+ target cells. *Res. Virol* **146**, 5-17 (1995).
151. Miura, Y. & Koyanagi, Y. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol* **15**, 169-178 (2005).
152. Fischer, R., Baumert, T. & Blum, H.-E. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J. Gastroenterol* **13**, 4865-4872 (2007).
153. Hayashi, N. & Mita, E. Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis. *J. Viral Hepat* **6**, 357-365 (1999).
154. Nasir, A., Arora, H.S. & Kaiser, H.E. Apoptosis and pathogenesis of viral hepatitis C--an update. *In Vivo* **14**, 297-300 (2000).
155. Dianzani, U. u. a. Role of FAS in HIV infection. *Curr. HIV Res* **1**, 405-417 (2003).
156. Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A., Herzenberg, L.A. & Herzenberg, L.A. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Exp. Med* **181**, 2029-2036 (1995).
157. Patki, A.H., Georges, D.L. & Lederman, M.M. CD4+T-cell counts, spontaneous apoptosis, and Fas expression in peripheral blood mononuclear cells obtained from human immunodeficiency virus type 1-infected subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**, 736-741 (1997).
158. Böhler, T. u. a. Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Pediatr. Infect. Dis. J* **16**, 754-759 (1997).
159. Aries, S.P., Schaaf, B., Müller, C., Dennin, R.H. & Dalhoff, K. Fas (CD95) expression on CD4+ T cells from HIV-infected patients increases with disease progression. *J. Mol. Med* **73**, 591-593 (1995).
160. Bahr, G.M. u. a. Elevated serum level of Fas ligand correlates with the asymptomatic stage of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**, 896-898 (1997).
161. Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D.H., Staiano-Coico, L. & Laurence, J. HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4+ T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid. *Immunology* **87**, 581-585 (1996).
162. Hosaka, N., Oyaizu, N., Kaplan, M.H., Yagita, H. & Pahwa, S. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Infect. Dis* **178**, 1030-1039 (1998).
163. Hosaka, N., Oyaizu, N., Than, S. & Pahwa, S. Correlation of loss of CD4 T cells with plasma levels of both soluble form Fas (CD95) Fas ligand (FasL) in HIV-infected infants. *Clin. Immunol* **95**, 20-25 (2000).
164. Calabrese, F. u. a. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology* **31**, 1153-1159 (2000).
165. Zaki, M.E.S., Auf, F.A., Ghawalby, N.A.E. & Saddal, N.M.E. Clinical significance of serum soluble Fas, Fas ligand and fas in intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. *Immunol. Invest* **37**, 163-170 (2008).
166. Taya, N. u. a. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br. J. Haematol* **110**, 89-97 (2000).
167. Panasiuk, A., Parfieniuk, A., Zak, J. & Flisiak, R. Association among Fas expression in leucocytes, serum Fas and Fas-ligand concentrations and hepatic inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* **30**, 472-478 (2010).

168. Toyoda, M. u. a. Role of serum soluble Fas/soluble Fas ligand and TNF-alpha on response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C. *Liver* **20**, 305-311 (2000).
169. Tortorella, C. u. a. sICAM-1, sCD95 and sCD95L levels in chronic liver diseases of different etiology. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **22**, 19-33 (2000).
170. Macias, J. u. a. Increased hepatocyte fas expression and apoptosis in HIV and hepatitis C virus coinfection. *J. Infect. Dis* **192**, 1566-1576 (2005).
171. Winslow, D.L. Hepatocyte apoptosis in hepatitis C/HIV co-infection. *AIDS Alert* **21**, 142-143 (2006).
172. Sharma, K. u. a. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol. Ther* **88**, 333-347 (2000).
173. Nunnari, G. u. a. Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Neurovirol* **11**, 319-328 (2005).
174. Llano, A. u. a. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol* **75**, 10319-10325 (2001).
175. Fluor, C. u. a. Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection. *J. Immunol* **178**, 5340-5350 (2007).
176. Beq, S., Delfraissy, J.-F. & Theze, J. Interleukin-7 (IL-7): immune function, involvement in the pathogenesis of HIV infection and therapeutic potential. *Eur. Cytokine Netw* **15**, 279-289 (2004).
177. Li-Weber, M., Laur, O., Dern, K. & Krammer, P.H. T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB. *Eur. J. Immunol* **30**, 661-670 (2000).
178. Zignego, A.L., Giannini, C., Monti, M. & Gragnani, L. Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Dig Liver Dis* **39 Suppl 1**, S38-45 (2007).
179. Castillo, I. u. a. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* **54**, 682-685 (2005).
180. Herbeuval, J.-P. u. a. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* **105**, 2458 -2464 (2005).
181. Gibellini, D. u. a. RANKL/OPG/TRAIL plasma levels and bone mass loss evaluation in antiretroviral naive HIV-1-positive men. *J. Med. Virol* **79**, 1446-1454 (2007).
182. Yang, Y. u. a. Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *J. Virol* **77**, 6700-6708 (2003).
183. Herbeuval, J.-P. u. a. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* **106**, 3524-3531 (2005).
184. Herbeuval, J.-P. u. a. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 13974-13979 (2005).
185. Abdulghani, J. & El-Deiry, W.S. TRAIL receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 1091-1108 (2010).
186. Wang, S. TRAIL: a sword for killing tumors. *Curr. Med. Chem* **17**, 3309-3317 (2010).
187. Cummins, N. & Badley, A. The TRAIL to viral pathogenesis: the good, the bad and the ugly. *Curr. Mol. Med* **9**, 495-505 (2009).
188. Falschlehner, C., Schaefer, U. & Walczak, H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* **127**, 145-154 (2009).
189. Herbeuval, J.-P. & Shearer, G.M. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin. Immunol* **123**, 121-128 (2007).
190. Huang, Y., Erdmann, N., Zhao, J. & Zheng, J. The signaling and apoptotic effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in HIV-1 associated dementia. *Neurotox Res* **8**, 135-148 (2005).
191. Chou, A.-H. u. a. Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J. Immunol* **174**, 2160-2166 (2005).
192. Lan, L. u. a. Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J. Immunol* **181**, 4926-4935 (2008).
193. Roger, P.M. u. a. Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is associated with a lower level of CD4+ T cell apoptosis in HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol* **118**, 412-416 (1999).
194. Dieye, T.N. u. a. Spontaneous apoptosis and highly active antiretroviral therapy (HAART). *Biomed. Pharmacother* **54**, 16-20 (2000).
195. Porter, K. u. a. Determinants of survival following HIV-1 seroconversion after the introduction of HAART. *Lancet* **362**, 1267-1274 (2003).

196. van Sighem, A.I., Gras, L.A.J., Reiss, P., Brinkman, K. & de Wolf, F. Life expectancy of recently diagnosed asymptomatic HIV-infected patients approaches that of uninfected individuals. *AIDS* **24**, 1527-1535 (2010).
197. Mocroft, A. u. a. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* **362**, 22-29 (2003).
198. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* **372**, 293-299 (2008).
199. Pakker, N.G. u. a. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat. Med* **4**, 208-214 (1998).
200. Kaufmann, G.R., Zaunders, J. & Cooper, D.A. Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy. *Sex Transm Infect* **75**, 218-224 (1999).
201. Wasmuth, J.-C., Hackbarth, F., Rockstroh, J.K., Sauerbruch, T. & Spengler, U. Changes of lymphocyte apoptosis associated with sequential introduction of highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* **4**, 111-119 (2003).
202. Rong, L. & Perelson, A.S. Modeling latently infected cell activation: viral and latent reservoir persistence, and viral blips in HIV-infected patients on potent therapy. *PLoS Comput. Biol* **5**, e1000533 (2009).
203. Shen, L. & Siliciano, R.F. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J. Allergy Clin. Immunol* **122**, 22-28 (2008).
204. Sedaghat, A.R., Siliciano, R.F. & Wilke, C.O. Low-level HIV-1 replication and the dynamics of the resting CD4+ T cell reservoir for HIV-1 in the setting of HAART. *BMC Infect. Dis* **8**, 2 (2008).
205. Jin, C.-Z. u. a. [Expression of CD38 and HLA-DR on CD8+ T cells in pediatric AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART)]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **49**, 49-52 (2011).
206. Bisset, L.R. u. a. Highly active antiretroviral therapy during early HIV infection reverses T-cell activation and maturation abnormalities. Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* **12**, 2115-2123 (1998).
207. Franco, J.M. u. a. Reduction of immune system activation in HIV-1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **18**, 733-736 (1999).
208. Ensolì, F. u. a. Decreased T cell apoptosis and T cell recovery during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin. Immunol* **97**, 9-20 (2000).
209. Ostrowski, S.R., Katzenstein, T.L., Pedersen, B.K., Gerstoft, J. & Ullum, H. Residual viraemia in HIV-1-infected patients with plasma viral load  $\leq 20$  copies/ml is associated with increased blood levels of soluble immune activation markers. *Scand. J. Immunol* **68**, 652-660 (2008).
210. Almeida, C.-A.M., Price, P. & French, M.A.H. Immune activation in patients infected with HIV type 1 and maintaining suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 1351-1355 (2002).
211. Weaver, J.G.R. u. a. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J. Clin. Invest* **115**, 1828-1838 (2005).
212. Dewan, M.Z. u. a. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* **107**, 716-724 (2006).
213. Gaedicke, S. u. a. Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis. *Cancer Res* **62**, 6901-6908 (2002).
214. Matarrese, P., Giammarioli, A.M., Cauda, R. & Malorni, W. Antiapoptotic activity by HIV protease inhibitors either alone or boosted. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **31**, 545-546 (2002).
215. André, P. u. a. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 13120-13124 (1998).
216. Ikezoe, T. u. a. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Mol. Cancer Ther* **3**, 473-479 (2004).
217. de Oliveira Pinto, L.M. u. a. Lack of control of T cell apoptosis under HAART. Influence of therapy regimen in vivo and in vitro. *AIDS* **16**, 329-339 (2002).
218. Benveniste, O. u. a. Possible mechanism of toxicity of zidovudine by induction of apoptosis of CD4+ and CD8+ T-cells in vivo. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **20**, 896-897 (2001).
219. Grelli, S. u. a. Spontaneous and anti-Fas-induced apoptosis in lymphocytes from HIV-infected patients undergoing highly active anti-retroviral therapy. *AIDS* **14**, 939-949 (2000).
220. Gougeon, M.L., Lecoœur, H. & Sasaki, Y. Apoptosis and the CD95 system in HIV disease: impact of highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Immunol. Lett* **66**, 97-103 (1999).
221. Badley, A.D. u. a. In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients. *J. Clin. Invest* **102**, 79-87 (1998).



222. Dyrhol-Riise, A.M. u. a. The Fas/FasL system and T cell apoptosis in HIV-1-infected lymphoid tissue during highly active antiretroviral therapy. *Clin. Immunol* **101**, 169-179 (2001).
223. Herbeuval, J.-P. u. a. HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques. *AIDS* **23**, 35-40 (2009).
224. Ohnismus, H., Heinkelein, M. & Jassoy, C. Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1. *J. Immunol* **159**, 5246-5252 (1997).
225. Roggero, R. u. a. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J. Virol* **75**, 7637-7650 (2001).
226. Anderson, K.B., Guest, J.L. & Rimland, D. Hepatitis C virus coinfection increases mortality in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era: data from the HIV Atlanta VA Cohort Study. *Clin. Infect. Dis* **39**, 1507-1513 (2004).
227. De Luca, A. u. a. Coinfection with hepatitis viruses and outcome of initial antiretroviral regimens in previously naive HIV-infected subjects. *Arch. Intern. Med* **162**, 2125-2132 (2002).
228. Braitstein, P. u. a. Immunologic response to antiretroviral therapy in hepatitis C virus-coinfected adults in a population-based HIV/AIDS treatment program. *J. Infect. Dis* **193**, 259-268 (2006).
229. Yacisin, K., Maida, I., Ríos, M.J., Soriano, V. & Núñez, M. Hepatitis C virus coinfection does not affect CD4 restoration in HIV-infected patients after initiation of antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 935-940 (2008).
230. Sulkowski, M.S., Moore, R.D., Mehta, S.H., Chaisson, R.E. & Thomas, D.L. Hepatitis C and progression of HIV disease. *JAMA* **288**, 199-206 (2002).
231. Shafran, S.D. Early initiation of antiretroviral therapy: the current best way to reduce liver-related deaths in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **44**, 551-556 (2007).

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Klinischer Verlauf der HIV-Infektion .....	3
Abb. 1.2: Schematischer Aufbau des HI-Virus.....	5
Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des Hepatitis C-Virus.....	11
Abb. 1.4: Signalwege der Apoptose. ....	16
Abb. 3.1: Prinzipielle Berechnung von $\Delta$ Ct-Werten. ....	30
Abb. 3.2: Schematischer Versuchsaufbau der <i>in vitro</i> Induktion von Apoptose.....	31
Abb. 3.3: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des TUNEL-Assays. ....	33
Abb. 3.4: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des PARP-Assays. ....	34
Abb. 3.5: Schematischer Ablauf der Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des Caspase-3 Assays. ....	35
Abb. 4.1: Amplifikation von CCR5-Genkopien und sjTREC <sub>s</sub> mittels Echtzeit-PCR. ....	40
Abb. 4.2: sjTREC-Konzentrationen von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen. ....	40
Abb. 4.3:TREC-Konzentrationen von virämischen und avirämischen HIV(+)-Patienten. ....	42
Abb. 4.4: Durchflusszytometrische Analyse von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	43
Abb. 4.5: Assoziation zweier Apoptose-Assays bzgl. der gemessenen CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate. ....	44
Abb. 4.6: CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate verschiedener Patientengruppen. ....	45
Abb. 4.7: Assoziation zwischen HIV-Last und CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose.....	46
Abb. 4.8: Einfluss der HAART auf die CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose. ....	47
Abb. 4.9: Einfluss von Protease-Inhibitoren auf die CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose. ....	49
Abb. 4.10: Veränderungen der CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose im Verlauf der Immunrestitution. ....	50
Abb. 4.11: Fas-Oberflächenexpression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	52
Abb. 4.12: Fas-Oberflächenexpression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Patientengruppen.....	53
Abb. 4.13: FasL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	54
Abb. 4.14: Expression und Sekretion von zellulärem und löslichem FasL.....	55
Abb. 4.15: Assoziation zwischen FasL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und FasL-Serumspiegel. ....	56
Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Analyse von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach <i>in vitro</i> Induktion von Apoptose. ....	57
Abb. 4.17: <i>In vitro</i> Induktion von Apoptose bei CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	58
Abb. 4.18: Einfluss der HAART auf die Fas-Oberflächenexpression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	59
Abb. 4.19: Einfluss der HAART auf die Expression und Sekretion von FasL. ....	61
Abb. 4.20: Einfluss der HAART auf die <i>in vitro</i> Induktion von Apoptose bei CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	62
Abb. 4.21: Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	63
Abb. 4.22: Oberflächenexpression von TRAIL auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	64
Abb. 4.23: Serumspiegel löslichen TRAILS.....	65
Abb. 4.24: Einfluss der HAART auf die TRAIL-Serumkonzentration und Oberflächenexpression.....	66
Abb. 4.25: Oberflächenexpression des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	68
Abb. 5.1: Vereinfachtes Modell der Fas-vermittelten Apoptose bei HIV/HCV-Koinfektion.....	78
Abb. 5.2: Einfluss der cART auf die Fas-vermittelte Apoptose bei HIV- und HIV/HCV-Koinfektion. ....	83

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Demographische und klinische Daten der Patientengruppen .....	23
Tab. 2.2: Charakteristika ausgewählter cART-behandelter Patienten .....	24
Tab. 3.1: CCR5-Primer-Sequenzen .....	28
Tab. 3.2: Schema des Reaktionsansatzes (CCR5) .....	28
Tab. 3.3: Protokoll des PCR-Programms (CCR5).....	28
Tab. 3.4: Sequenzen der sjTREC-Primer und Sonden.....	29
Tab. 3.5: Schema des Reaktionsansatzes (sjTREC) .....	29
Tab. 3.6: Protokoll des PCR-Programms (sjTREC) .....	29
Tab. 4.1: sjTREC-Konzentrationen von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen .....	41
Tab. 4.2: sjTREC-Konzentrationen bei virämischen und avirämischen HIV(+) Patientengruppen .....	41
Tab. 4.3: Mittlere CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate verschiedener Patientengruppen.....	44
Tab. 4.4: Vergleich der CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate bei HIV-positiven Patientengruppen .....	48
Tab. 4.5: Vergleich der mittleren CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose bei HIV-RNA(-) Patientengruppen.....	48
Tab. 4.6: CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptose und HIV-Status bei HIV-Patienten im Verlauf einer HAART .....	51
Tab. 4.7: Fas-Oberflächenexpression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen verschiedener Patientengruppen .....	53
Tab. 4.8: Expression und Sekretion des FasL in verschiedenen Patientengruppen .....	55
Tab. 4.9: CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate nach Koinkubation mit rhFasL .....	57
Tab. 4.10: Fas-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei HIV-Patienten mit nicht-nachweisbare HIV-RNA .....	59
Tab. 4.11: Expression des FasL in verschiedenen Patientengruppen .....	60
Tab. 4.12: Serumspiegel des löslichen FasL in verschiedenen Patientengruppen .....	60
Tab. 4.13: CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate von HIV-positiven Patienten nach Koinkubation mit rhFasL .....	61
Tab. 4.14: Anteil DR4-positiver T-Helferzellen bei verschiedenen Patientengruppen .....	63
Tab. 4.15: TRAIL-Serumspiegel bei verschiedenen Patientengruppen .....	66
Tab. 4.16: TRAIL-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei verschiedenen Patientengruppen .....	67
Tab. 4.17: CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Apoptoserate nach Koinkubation mit rhTRAIL .....	67
Tab. 4.18: Expression von TNF- $\alpha$ -R1 auf der Oberfläche von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	69

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	<i>engl. activation-induced cell death</i>
AIDS	<i>engl. Acquired Immune Deficiency syndrome</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>engl. analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin, Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintri-phosphat
AZT	Azidothymidin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl. bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
CAD	Caspase-aktivierte DNase
cART	<i>engl. combined antiretroviral therapy</i>
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA ( <i>engl. complementary DNA</i> )
CD	<i>engl. cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Ct	<i>engl. cycle threshold</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	Todesrezeptor ( <i>engl. death receptor</i> )
dUTP	Desoxyribouridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl. enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere ( <i>lat. et aliter</i> )
FACS	<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>engl. fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Energieresonanztransfer
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>engl. forward scatter</i> )
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gp	Glykoprotein
GT	Glutamyl-Transferase
h	Stunde
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom ( <i>engl. hepatocellular carcinoma</i> )
HCV	Hepatitis-C Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
His6	Hexa-Histidin-Rest
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
IVDU	<i>engl. intravenous drug users</i>
IU	<i>engl. International Units</i>

kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
lat.	lateinisch
LDL	<i>engl. low density lipoprotein</i>
Log	logarithmisch
LTR	<i>engl. long terminal repeat</i>
M	Molar
m	Milli, Meter
μ	Mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung ( <i>engl. magnetic activated cell sorter</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl. major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>engl. messenger ribonucleic acid</i> )
n	nano, Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleos(t)idischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NS	Nichtstrukturprotein
NTR	nicht-translatierte Region
ORF	<i>engl. open reading frame</i>
p	statistische Wahrscheinlichkeit, pico, Protein
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	<i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl. phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pH	<i>lat. potentia Hydrogenii</i>
PI	Protease-Inhibitor, Propidiumiodid
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur, Reverse-Transkription
RTE	<i>engl. recent thymic emigrants</i>
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl. standard error of mean</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>engl. sideward scatter</i> )
SIV	simianes Immundefizienz-Viren
sj	<i>engl. signal joint</i>
Tab.	Tabelle
tat	<i>engl. transactivator of transcription</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>engl. TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TREC	<i>T cell receptor excision circles</i>
TUNEL	<i>engl. TdT-mediated dUTP-FITC nick end labelling</i>
U	Unit(s), Einheit von Enzymaktivität
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen ( <i>engl. volume to volume</i> )
vs.	<i>lat. versus</i>
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen ( <i>engl. weight to volume</i> )
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

## 7 Veröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge:

### Publikationen als Erstautor:

1. **Körner C**, Krämer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, Oldenburg J, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4<sup>+</sup> T-cells in HIV-positive patients. *Clinical Science* (London). 2009 May 14;116(12):861-70.
2. **Körner C**, Tolksdorf F, Riesner K, Krämer B, Schulte D, Nattermann J, Rockstroh J, Spengler U. Hepatitis C co-infection enhances sensitization of CD4<sup>+</sup> T cells towards Fas-induced apoptosis in viremic and HAART-controlled HIV-1 positive patients. *Antiviral Therapy* (akzeptiert am 15.02.2011).

### Ausgewählte Kongressbeiträge:

- 2010 **Posterpräsentation** auf der 17<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Titel: Hepatitis C Co-infection Sensitizes CD4<sup>+</sup> T Cells Towards Fas-induced Apoptosis in Viremic HIV-Positive Patients.
- Posterpräsentation** auf der 45. Jahrestagung der European Association for the Study of the Liver (EASL). Titel: Hepatitis C co-infection sensitizes CD4<sup>+</sup> T cells towards Fas-induced apoptosis in viremic HIV-positive patients.
- 2009 **Vortrag** auf dem 12. Europäischen AIDS-Kongress (EACS). Hepatitis C co-infection sensitizes CD4<sup>+</sup> T cells towards Fas-induced apoptosis in viremic HIV-positive patients.
- Posterpräsentation** auf der 16<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Titel: Effects of HCV Co-infection on the Expression of Death Receptors and Their Corresponding Ligands in HIV<sup>+</sup> Patients with and without HAART.
- 2008 **Posterpräsentation** auf der 15<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Titel: HCV co-infection is associated with increased CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis in HIV-infected patients – Disappearance of this effect upon successful HAART.
- 2007 **Vortrag** auf dem 11. Europäischen AIDS-Kongress (EACS). Titel: Investigation of CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis rates in HIV- and HIV/HCV co-infected patients treated with a highly active anti-retroviral therapy (HAART).
- Vortrag** auf dem Deutsch-Österreichischen AIDS-Kongress (DÖAK). Titel: Investigation of CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis rates in HIV- and HIV/HCV-coinfected patients treated with a highly active anti-retroviral therapy (HAART).

**Weitere Publikationen als Koautor:**

1. Coenen M, Nischalke HD, Krämer B, Langhans B, Glässner A, Schulte D, **Körner C**, Sauerbruch T, Nattermann J, Spengler U. Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like receptor 2. *Laboratory Investigation*. 2011 May 2. [Epub ahead of print]
2. Nischalke HD, Coenen M, Berger C, Aldenhoff K, Müller T, Berg T, Krämer B, **Körner C**, Odenthal M, Schulze F, Grünhage F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The toll-like receptor 2 (TLR2) -196 to -174 del/ins polymorphism affects viral loads and susceptibility to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *International Journal of Cancer*. 2011 Apr 15. [Epub ahead of print]
3. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Krämer B, **Körner C**, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Laboratory Investigation*. 2011 Feb;91(2):241-51.
4. Sass V, Schneider T, Wilmes M, **Körner C**, Tossi A, Novikova N, Shamova O, Sahl HG. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infection and Immunity*. 2010 Jun;78(6):2793-800.
5. Krämer B, Schulte D, **Körner C**, Zwank C, Hartmann A, Michalk M, Söhne J, Langhans B, Nischalke HD, Coenen M, Möhl C, Vogt A, Hennenberg M, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. Regulation of NK cell trafficking by CD81. *European Journal of Immunology*. 2009 Dec;39(12):3447-58.
6. Schulte D, Vogel M, Langhans B, Krämer B, **Körner C**, Nischalke HD, Steinberg V, Michalk M, Berg T, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U, Nattermann J. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2009 Nov 1;200(9):1397-401.

**Weitere Kongressbeiträge:**

- 2011 **Posterpräsentation** auf der 46. Jahrestagung der European Association for the Study of the Liver (EASL). Titel: TRAIL receptor I polymorphisms C626G and A638C are associated with an increased risk for the development of hepatocellular carcinoma (HCC) in HCV-infected patient.
- 2010 **Posterpräsentation** auf der 45. Jahrestagung der European Association for the Study of the Liver (EASL). Titel: NKp46<sup>HIGH</sup> and NKp46<sup>DIM</sup> expression defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets that are altered in chronic hepatitis C.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Spengler und Herrn Prof. Dr. Jacob Nattermann danke ich für die Auswahl des interessanten Themas, die kontinuierliche Unterstützung bei der Dissertation und das in mich gesetzte Vertrauen bei der Umsetzung wissenschaftlicher Projekte. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Jürgen Rockstroh bedanken, der mich wie Herr Prof. Spengler und Herr Prof. Nattermann stets gefördert und mich in die wissenschaftliche Gesellschaft eingeführt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Herzog bedanken, der als zweiter Betreuer diese Arbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät vertrat, sowie bei Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus, der sich freundlicherweise als weiterer Gutachter zur Verfügung stellte.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Immunologischen Labors für die tolle Zeit während dieser Promotion innerhalb und außerhalb des Labors. Dabei möchte ich vor allem Claudia, Moni, Caro, Jenny, Bettina, Simone, Franziska, Pavlos und Hans Dieter danke sagen, an die ich mich bei praktischen und theoretischen Fragen immer wenden konnte. Im Weiteren möchte ich bei allen Mitarbeitern und Ärzten der Immunologischen Ambulanz für ihre Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt Mr. Krämer, Dr. Daniela Schulte, sowie Maari und Andy, mit denen das Doktoranden-Dasein im Büro und bei Kongressen immer ein Erlebnis war.

Ein großes Dankeschön geht an Michael Gusovius für die Illustrationen. Ein Dank auch an Anne Gottzein und alle weiteren Menschen, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.

Am Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium der Biologie ermöglicht haben; bei meiner gesamten Familie und bei all meinen Freunden, im Besonderen Fips, Gusi, Fred und Max, für ihre Unterstützung und ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit.



## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

### **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, den 07.06.2010

Christian Körner