

**Hat eine Koinfektion mit GBV-C Auswirkungen auf
die Klinik von HIV?**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von
Markus Neibecker
aus Trier**

Bonn, 2010

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

Medizinische Klinik und Poliklinik I
Direktor: Prof. Dr. T. Sauerbruch

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

Tag der Promotion: 15.11.2010

Erscheinungsjahr: 2011

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeiten:

GB Virus C (GBV-C) coinfection in advanced HIV disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4⁺ T cells

Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, Tural C, Clotet B, Blackard JT, Kupfer B, Luechters G, Chung RT, Rockstroh JK, Spengler U

accepted by Antiviral Therapy

Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I-IV
II	Abkürzungsverzeichnis.....	V-VII
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Allgemeine Einleitung.....	1
1.1.1	Die HI-Virus Infektion	2
1.1.2	HGV/GB-Virus C	7
1.2	Die GBV-C und HIV-Koinfektion	10
1.3	Hypothesen zur Interaktion von HIV und GBV-C	13
1.3.1	Zytokine und ihre Rolle bei der HIV bzw. GBV-C/HIV-Koinfektion.....	15
1.3.2	Chemokine und Chemokinrezeptoren	17
1.4	Ziele der Arbeit.....	25
2	MATERIAL	27
2.1	Reagenzien zur Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	27
2.1.1	Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese	27
2.2	Reagenzien für den Nachweis von GBV-C	28
2.2.1	Primer für die GBV-C RT-PCR und „Nested“-PCR.....	28
2.2.2	Primer für die RT-Echtzeit-PCR zum Nachweis von GBV-C	29
2.3	Primer für die Sequenzierung der GBV-C-E2 Region	30
2.4	Reagenzien für die CCR5-Genotypisierung	31
2.4.1	Primer für die CCR5-Genotypisierung mit SYBR-Green I.....	32
2.4.2	Reagenzien für die Separation von peripheren Blutlymphozyten	32
2.4.3	Reagenzien für die Kultivierung von peripheren Blutlymphozyten.....	32
2.5	Reagenzien für die Durchflusszytometrie	32
2.6	Reagenzien für die Stimulationsexperimente	33
2.7	Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von MIP-1α, MIP-1β, IP-10, IL-12 und IFN-γ im Serum	33
2.8	Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von RANTES in Zellkulturüberständen	33

2.9	Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von GBV-C-E2 Antikörpern im Serum	33
2.10	Sonstige Labormaterialien	34
2.11	Geräte	34
3	METHODEN	36
3.1	Gewinnung von Nukleinsäuren	36
3.1.1	RNS-Extraktion	36
3.1.2	DNS-Extraktion	37
3.2	Methoden zur Detektion des GBV-C-Virus	38
3.2.1	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
3.2.2	RT-PCR	39
3.2.3	„Nested“-PCR	41
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.5	GBV-C-Status und Genotypisierung	42
3.3	Echtzeit-PCR	43
3.3.1	Echtzeit-PCR mit dem LightCycler-System	43
3.3.2	Schmelzkurvenanalyse	45
3.3.3	Echtzeit-RT-PCR zum quantitativen Nachweis von GBV-C	46
3.4	Qualitativer Nachweis der GBV-C-E2 Antikörper mittels ELISA	47
3.5	Sequenzierung des GBV-C-E2 Gens	49
3.6	Phylogenetische Analyse der 5' UTR und des GBV-C-E2 Gens	52
3.7	Bioinformatische Analyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz	53
3.8	Stimulation von RANTES mit rekombinantem GBV-C-E2 und GBV-C-Viruspartikeln unterschiedlicher Genotypen	53
3.8.1	Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficoll-dichtegradienten-Zentrifugation	54
3.8.2	Untersuchungen zur Stimulation einer RANTES Sekretion bei PBMCs	55
3.8.3	RANTES Quantifizierung mittels ELISA	56
3.8.4	Bindungseffizienz des monoklonalen bzw. polyklonalen Anti-GBV-C-E2 Antikörpers	57
3.9	Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen	58
3.9.1	CCR5-Genotypisierung mittels SYBR [®] Green	58
3.9.2	Durchflusszytometrie (FACS)	59
3.9.3	Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	62

3.10	Bestimmung des Serumspiegels von MIP-1α, MIP-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, IFN-γ und TNF in Seren von HIV⁺ bzw. HIV/GBV-C koinfizierten Patienten.....	64
3.10.1	Bestimmung der Chemokine IL12, IP-10, IFN- γ MIP-1 α , und MIP-1 β mittels ELISA	66
3.11	Statistische Analysen	68
4	ERGEBNISSE.....	69
4.1	Epidemiologische Analyse der HIV-Kohorten aus Bonn und Barcelona	69
4.1.1	Rekrutierung der multizentrischen HIV-Kohorte Bonn und Barcelona	69
4.1.2	Zusammensetzung der HIV-Kohorten aus Bonn und Barcelona	70
4.1.3	Koinfektion mit GBV-C	73
4.1.4	Der Einfluss der HAART-Therapie auf die HIV-Viruslast und die CD4 ⁺ T-Zellzahl	80
4.1.5	Der Einfluss des GBV-C-Genotyps.....	82
4.2	Unterschiede in den Serumspiegeln von IP-10 und IFN-γ in Seren HIV monoinfizierter und HIV/GBV-C koinfizierter Patienten	87
4.2.1	Der Einfluss von HAART auf IFN- γ und IP-10 Serumspiegel	91
4.2.2	Zusammenhänge zwischen GBV-C-Viruslast, IFN- γ , und IP-10 mit der HIV-Viruslast und CD4 ⁺ T-Zellzahl	95
4.3	Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten	100
4.3.1	Die CCR5- und CXCR4-Oberflächenexpression auf CD4 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der CD4 ⁺ T-Zellzahl.....	104
4.4	Stimulation von RANTES mit rekombinantem GBV-C-E2 und GBV-C-Viruspartikeln.....	108
4.5	Analyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz	110
4.5.1	Mutationsanalyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz	111
4.5.2	Vergleichende phylogenetische Analyse der GBV-C-E2 und 5'UTR Sequenz....	117
5	DISKUSSION.....	119
5.1	Die HIV/GBV-C-Koinfektion.....	119
5.2	Der positive Einfluss einer GBV-C-Koinfektion auf die Klinik von HIV	122
5.3	Welche Pathomechanismen liegen der Korrelation von GBV-C-Viruslast mit HIV-Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl zu Grunde?	124
5.3.1	Modifikationen des Zytokinmilieus.....	125
5.3.2	Modulation von Chemokinrezeptoren und deren Liganden	129
5.3.3	Induktion von RANTES	131
5.3.4	Das GBV-C-E2 Protein, Ursprung der Genotyp-abhängigen Effekte?.....	132

5.4	Zusammenfassung.....	135
6	LITERATURVERZEICHNIS	137
7	ANHANG	151
8	DANKSAGUNG	234
9	LEBENS LAUF.....	235

II. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	engl. acquired immunodeficiency syndrome
APC	Allophycocyanin
AT-Basenpaar	Adenin-Thymidin-Basenpaar
Abb.	Abbildung
As	Aminosäuren
bp	Basenpaar
BSA	engl. bovine serum albumine
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid
CD	engl. cluster of differentiation
CHO	engl. chinese hamster ovary
CSF	engl. colony stimulating factors
CXCR	CXC-Chemokinrezeptoren
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothretiol
E	engl. Envelope protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme linked immuno sorbent assay
<i>env</i>	engl. Envelope
Fa.	Firma
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FASTA	engl. FAST-All
FCS	engl. fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FRET	engl. fluorescence resonance energy transfer
FSC	engl. forward light scatter
for.	engl. forward

g	Erdbeschleunigung
GBV-C	engl. GB-virus-C
GC-Basenpaar	Guanin-Cytosin-Basenpaar
gp	Glykoprotein
G-Protein	heterotrimeres GTP-bindendes Protein
GPCR	engl. G protein-coupled receptor
HAART	engl. highly active antiretroviral therapy
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGV	Hepatitis-G-Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon (engl. interferon)
IL	Interleukin
IP	engl. IFN-inducible protein
i.v.	intravenös
IRES	engl. internal ribosomal entry site
ivdu	engl. intravenous drug use
kb	Kilobasenpaare
kd	Kilodalton
LED	lichtemittierende Diode
LPS	Lipopolysaccharide
LTNP	engl. long time non progressors
Lsg.	Lösung
mA	milli-Ampere
mg	Milligramm
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
mm	Millimeter
mM	milli-Molar
ml	Milliliter
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
mut	mutiert
mV	milli-Volt

NK	engl. natural killer
OD	optische Dichte
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PBMC	engl. peripheral blood mono-nucleatear cells
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pH	lat. potentia Hydrogenii
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
RANTES	engl. regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
<i>rev</i>	engl. regulator of expression of virion proteins
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse-Transkription
SI	engl. syncytium inducing
TAE	engl. tris-acetate-EDTA
tat	engl. transactivator of transcription
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UTR	untranslated region
SSC	engl. side scatter
U/min	Umdrehungen/Minute
V	Volt
vs	lat. versus
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTL	Zytotoxische T-Zellen
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikro-Molar

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV, engl.: **h**uman **i**mmunodeficiency virus) – auch Menschliches Immunschwäche-Virus – führen bei den betroffenen Patienten zu AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*). Diese Epidemie verbreitet sich weltweit, meist durch heterosexuelle Kontakte, besonders in Ländern der Dritten Welt. HIV ist ein umhülltes Retrovirus, das sich in Zellen des Immunsystems vermehrt. Das Eindringen in die Zielzelle benötigt das Oberflächenmolekül CD4 und einen der Korezeptoren CCR5 bzw. CXCR4. Die Replikation erfordert dann zusätzliche Transkriptionsfaktoren, die in aktivierten T-Zellen exprimiert werden. Die Infektion mit dem HI-Virus führt langfristig zu einem massiven Verlust der CD4⁺ T-Zellen. Mit schwindender CD4⁺ T-Zellzahl wird der Wirt immer anfälliger für opportunistische Infektionen und Tumoren, die letztendlich zum Tode des infizierten Patienten führen.

Die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1996 hat die Entwicklung und den natürlichen Verlauf der HIV-Infektion stark verändert. Besseres Überleben der HIV-Infizierten auf Grund des Rückganges der Morbidität und Mortalität durch opportunistische Infektionen hat in den vergangenen Jahren andere Komplikationen, insbesondere die Koinfektion mit dem Flavivirus Hepatitis C (HCV), in den Vordergrund treten lassen.

Auf der Basis von Genom- und Sequenz-Vergleichen konnte ein enger Verwandter von HCV, GB Virus-C im Serum eines Patienten mit unklarer chronischer Hepatitis identifiziert werden (Linnen et al. 1996). Im Gegensatz zu HCV ist GBV-C ein lymphotropes Virus und repliziert vor allem in Zellen des Knochenmarks und der Milz, darunter auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes, z.B. auch den CD4 positiven T-Zellen (Xiang et al. 2000). GBV-C konnte bis heute nicht mit irgendeiner spezifischen Erkrankung assoziiert werden und scheint für seinen Wirt nicht pathogen zu sein (Polgreen et al. 2003).

Besondere Aufmerksamkeit erfuhr das GBV-C Virus, als erkannt wurde, dass eine GBV-C Koinfektion zu einer verlangsamten Progression von HIV und einer besseren Prognose von Patienten im Stadium AIDS führt.

Hierbei scheint das GBV-C Virus einen Einfluss auf die Oberflächenexpression der HIV Korezeptoren CCR5 und CXCR4, das Zytokinprofil HIV infizierter Patienten und die Replikation von HIV *in vivo* und *in vitro* zu haben (Heringlake et al. 1998; Tillmann et al. 2001a; Xiang et al. 2001; Nattermann et al. 2004; Williams et al. 2004). Im Rahmen dieser Dissertation wird untersucht, inwieweit die GBV-C Infektion bei Patienten der HIV Kohorten aus Bonn und Barcelona zu Veränderungen der Oberflächenrezeptoren und Immunregulation führt. Im Rahmen Studie soll der Einfluss von GBV-C auf die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 und das Zytokinprofil von HIV/GBV-C koinfizierten Patienten im Vergleich zu HIV monoinfizierten Patienten untersucht werden. Weiterhin sollen die Auswirkungen einer Bindung des GBV-C-Hüllproteins 2 (E2) auf die Expression von RANTES, die Struktur des GBV-C-E2 Proteins und die genetische Diversität von GBV-C charakterisiert werden.

Vor dem Hintergrund, dass eine GBV-C Koinfektion in mehreren unabhängigen Studien mit einem deutlichen Überlebensvorteil bei HIV Infizierten assoziiert war, wäre die Aufklärung der möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismen ein bedeutender Schritt, der auch zur Entwicklung neuartiger HIV Therapieansätze beitragen könnte.

1.1.1 Die HI-Virus Infektion

HIV-1 Viruspartikel sind ca. 100nm groß und werden von einer Lipoproteinhülle umgeben. Die Virushülle enthält 72 etwa 10nm große *env*-Glykoproteinkomplexe. Diese bestehen aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41). Die Virushülle enthält außerdem verschiedene Proteine der Wirtszelle, z.B. HLA Klasse I- und II-Moleküle, die beim Abschnüren des Virus ("budding") aus der virusproduzierenden Zelle inkorporiert werden. Zu diesen Wirtsproteinen gehören auch Adhäsionsproteine wie ICAM-1, welche das Anheften an neue Zielzellen erleichtern. Das p17-Matrixprotein befindet sich auf der Innenseite der Virushülle. Das p24-Kapsid-Antigen ("core antigen") ist von zylindrischer Gestalt und enthält zwei Kopien der HIV-RNS. Diese liegt als Protein-Nukleinsäurekomplex, gebunden an das Nukleoprotein p7 und die reverse Transkriptase p64 vor. Außer der reversen Transkriptase (RT) enthält das Viruspartikel auch andere Enzyme, die es für seine Vermehrung benötigt, wie z.B. die Integrase p32 und die Protease p10 (siehe Abbildung 1.1).

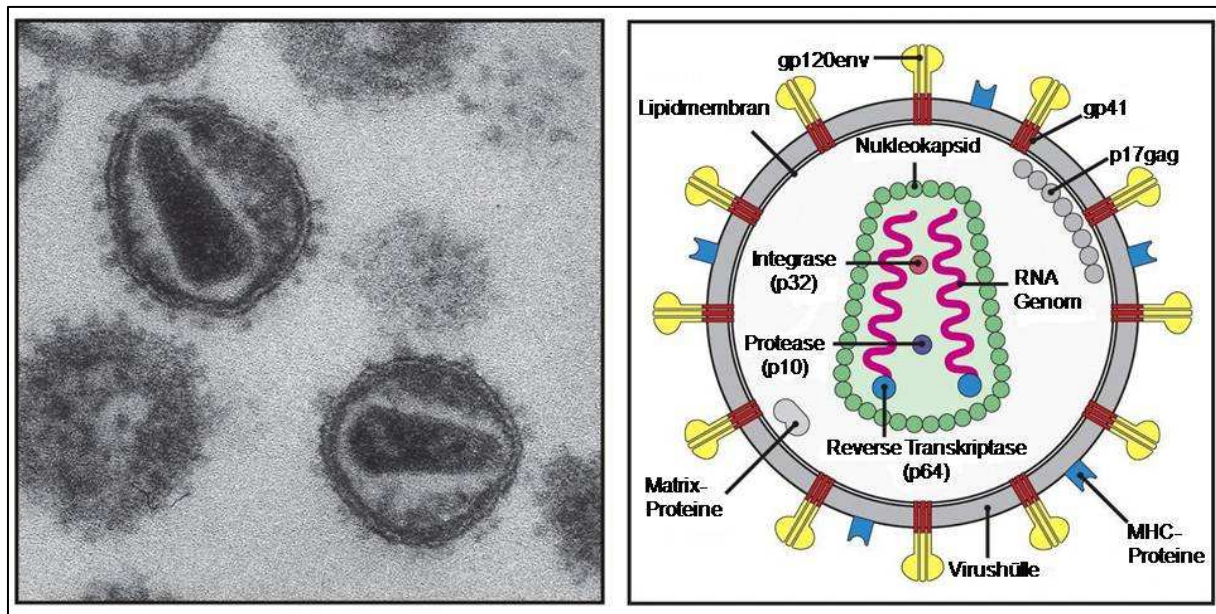


Abbildung 1.1.: Elektronenmikroskopisches Bild von HIV-1 links und schematischer Aufbau rechts (modifiziert nach Janeway's immunology 2008)

1.1.1.1 Die Epidemiologie des HI-Virus

Die Verbreitung von HIV hat sich in den letzten 25 Jahren zu einer Pandemie entwickelt, an der nach Schätzungen der Organisation UNAIDS bisher etwa 25 Millionen Menschen gestorben sind. Zurzeit sind etwa 33,2 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. In Deutschland lebten Ende 2007 rund 59.000 Menschen mit HIV, darunter etwa 47.000 Männer, rund 8.500 Frauen und rund 400 Kinder. Bei 8.700 Personen war AIDS bereits ausgebrochen. Im Jahr 2006 kam es zu ungefähr 2.700 Neuinfektionen. In der ersten Jahreshälfte 2007 wurden 1.334 Neuinfektionen registriert, 9% mehr als im Vorjahreszeitraum (1.224), wobei 64% der Neuinfektionen homosexuelle Männer betrafen. Eine weltweite Übersicht der Epidemiologie von HIV nach „AIDS epidemic update“ von UNAIDS, Stand Dezember 2007 (Update 2008) gibt Tabelle 1.1.

Tabelle1.1: Epidemiologie des HI-Virus nach UNAIDS Stand 2007-2008

HIV Infektionen im Jahr 2007		
	Total	33,2 [30,6-36,1]Mio.
	Erwachsene	30,8 [28,2-33,6]Mio.
	Frauen	15,4 [13,9-16,6]Mio.
	Kinder unter 15 Jahren	2,5 [2,2-2,6]Mio.
Neuinfektionen		
	Total	2,5 [1,8-4,1]Mio.
	Erwachsene	2,1 [1,4-3,6]Mio.
	Kinder unter 15 Jahren	0,42 [0,35-0,54]Mio.
AIDS Tote im Jahr 2007		
	Total	2,1 [1,9-2,4]Mio.
	Erwachsene	1,7 [1,6-2,1]Mio.
	Kinder unter 15 Jahren	0,33 [0,31-0,38]Mio.

Es sind folgende Infektionswege bekannt:

- sexuelle Transmission: mit über 75% der Fälle der häufigste Übertragungsweg
- parenterale Infektion: i.v.-Drogenabusus (ivdu), Therapie mit infizierten Blutprodukten (Hämophilie) oder Bluttransfusionen (Die letzten beiden Transmissionswege sind seit Einführung von HIV-Antikörper-Tests im Jahre 1985 in Europa selten)
- akzidentelle Verletzungen im medizinischen Bereich
- vertikale Übertragung von einer HIV infizierten Mutter auf das Kind während der Schwangerschaft, bzw. unter der Geburt

AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) stellt das am weitesten fortgeschrittene Stadium der Infektion dar, bei der durch das HIV (**h**umane **I**mmundefizienz-**V**irus), ein Immundefekt hervorgerufen wird. Klinisch manifestiert sich AIDS durch opportunistische Infektionen (*Pneumocystis carinii* Pneumonie, Toxoplasmose), sekundäre Neoplasien (Kaposi-Sarkom) und neurologische Erkrankungen (HIV-1 assoziierte Enzephalopathie) als Folge der geschädigten zellulären Immunität.

1.1.1.2 Immunpathogenese der HI-Virus Infektion

Das CD4 Oberflächenprotein stellt den primären Rezeptor für das HI-Virus dar. Dies erklärt die Spezifität des HI-Virus für Zellen des Immun- und zentralen Nervensystems (ZNS). CD4 ist ein 58 kDa schweres monomeres Glykoprotein und befindet sich auf der Oberfläche von ca. 60% aller T-Lymphozyten, von T-Zellvorläuferzellen in Knochenmark und Thymus, auf Monozyten und Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS. Die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an CD4 ist allerdings noch nicht ausreichend, um dem Virus das Eindringen in die Wirtszelle zu ermöglichen. Es müssen außerdem noch Korezeptoren vorhanden sein. Es sind im Normalfall die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. Danach unterscheidet man M-trope (Infektion über CCR5) und T-trope (Infektion über CXCR4) HI-Virusstämme. Im Detail läuft die Infektion der Zielzelle nach folgendem Schema ab:

Das virale Glykoprotein gp120 bindet an bestimmte Bereiche des CD4 Rezeptors, was zu einer Konformationsänderung von gp120 führt (**Schritt 1: Adsorption**). Diese Bindung an CD4 induziert eine Interaktion der V3-Schleife von gp120 mit dem jeweiligen Membran-Korezeptor CCR5 oder CXCR4. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung des Glykoproteins gp41, das nicht-kovalent an gp120 gebunden ist (**Schritt 2: Penetration**). Gp41, der transmembrane Anteil des Virushüllproteins gp160, spielt bei der Fusion der Virus-Hülle mit der Wirtszellmembran eine zentrale Rolle. Dies führt schließlich zur Insertion eines Fusionspeptids am hydrophoben gp41-NH₂-terminalem Ende in die Zellmembran der Zielzelle. Dadurch wird die Fusionierung des Virus mit der Zelle eingeleitet. Das Virusgenom wird in das Zytoplasma der Zelle eingeschleust, freigesetzt und die Replikation beginnt (**Schritt 3: Uncoating und Schritt 4: reverse Transkription**). Zunächst wird das virale Genom durch eine reverse Transkriptase in die provirale DNS umgeschrieben. In ruhenden T-Zellen verbleibt diese provirale DNS in linearer episomaler Form im Zytoplasma. In sich teilenden T-Zellen geht die provirale DNS in eine Ringform über, tritt in den Nukleus ein und wird danach durch das virale Enzym Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert (**Schritt 5: Integration**) (siehe Abbildung 1.2).

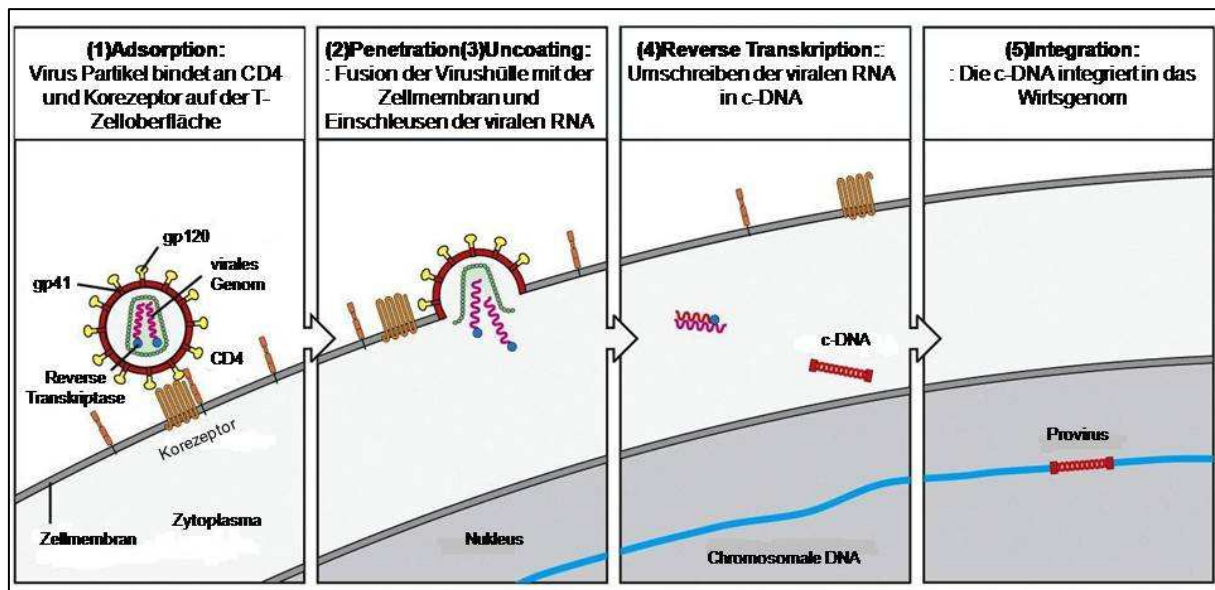


Abbildung 1.2.: Infektionszyklus des HI-Virus bis zur Integration ins Wirtsgenom (modifiziert nach Janeway's immunology 2008)

Nach der Integration kann das Provirus über Monate oder Jahre im Genom der Wirtszelle bleiben und eine latente Infektion verursachen. Alternativ kann die provirale DNS nach T-Zellaktivierung transkribiert (**Schritt 6: Transkription, Schritt 7: Translation**) werden. Hierbei werden die mRNS-Transkripte in die verschiedenen Gene durch Spleissen getrennt. Die früh exprimierten Gene *tat* und *rev* kodieren hierbei für den viralen Transaktivator Tat, der stabilisierende Wirkung auf die viralen RNS-Transkripte hat, und Rev, das einen Transport von ungespleissten und gespleissten mRNS-Abschnitten in das Zytoplasma ermöglicht. Mit ansteigender Menge von Rev werden immer mehr unprozessierte oder nur teilweise prozessierte Transkripte aus dem Zellkern exportiert, die dann entweder zu den Strukturproteinen gp160, Pol und Gag translatiert oder als ungespleisste RNS als neues virales Genom dienen und zu vollständigen Viruspartikeln zusammengesetzt werden (**Schritt 8: Assembly**). Die vollständigen Viren verlassen durch Knospung die infizierten Zellen (**Schritt 9: Budding (Knospung)**) (siehe Abbildung 1.3).

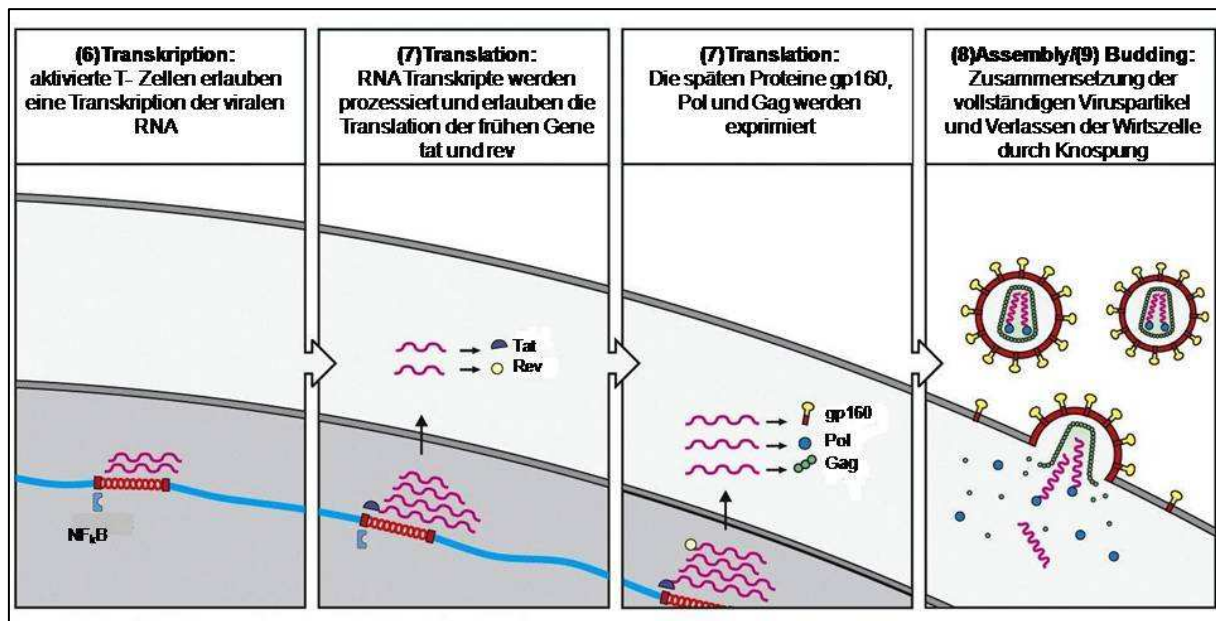


Abbildung 1.3.: Infektionszyklus des HI-Virus bis zur Knospung (modifiziert nach Janeway's immunology 2008)

Die produktive Infektion in Verbindung mit extensiver Knospung führt schließlich zum Tod der infizierten Zelle. Wichtig ist dabei, dass erst die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zelle nach Eintritt von HIV die Integration der proviralen DNS ermöglicht, was die Voraussetzung für die Synthese neuer Virionen ist. *In vitro* Untersuchungen zeigen zudem, dass HIV-1 sich bevorzugt in aktive Gene (sogenannte „hot spots“) integriert (Morrison et al. 2000; Zhuang et al. 2002). In dieser Hinsicht bietet das Mikromilieu des lymphatischen Gewebes ideale Bedingungen für die Replikation von HIV. Der enge räumliche Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen und $CD4^+$ T-Zellen, die Anwesenheit infektiöser Virionen im Bereich der follikulär dendritischen Zellen und das Vorhandensein proinflammatorischer Zytokine, wie $TNF\alpha$ oder IL-6, begünstigen die Induktion einer Virusreplikation in latent infizierten Zellen und verstärken das Ausmaß der Virusvermehrung in bereits infizierten Zellen. Zudem kommt es durch eine Freisetzung von mikrobiellen Produkten, wahrscheinlich aus dem Darm, zu einer systemischen Immunaktivierung (Brenchley et al. 2006).

1.1.2 HGV/GB-Virus C

Das GB Virus C wurde erstmals 1995 durch die *Virus Discovery Group* in den Abbott Laboratorien bei der Suche nach zusätzlichen Erregern einer Non-A-Non-B-Hepatitis bei einem Chirurgen mit den Initialen GB in einer westafrikanischen Population entdeckt (Simons et al. 1995).

Gleichzeitig wurde das HGV-Virus (Hepatitis-G-Virus) aus Plasma eines HCV infizierten Patienten isoliert (Linnen et al. 1996). Sequenzvergleiche beider Viren zeigten, dass es sich um verschiedene Isolate ein und desselben Virus handelte, deren Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen zu 86% bzw. 95% zueinander homolog waren (Alter 1996; Polgreen et al. 2003). Spätere Studien zeigten keinerlei Assoziation zwischen dem GBV-C Virus und der Hepatitis des Chirurgen aus Chicago, anderen Hepatitiden oder irgendeiner anderen Erkrankung (Rambusch et al. 1998; Stark et al. 1999). Im Folgenden wird für das HGV/GBV-C Virus einheitlich die Bezeichnung GBV-C verwendet.

GBV-C ist ein Vertreter der Flaviviridae, dessen Genom aus einem einzelsträngigen RNS-Molekül positiver Polarität von ca. 9,4 Kb Länge besteht. Wie bei allen Flaviviridae enthält es einen durchgehenden offenen Leserahmen, der für ein Polyprotein kodiert (Smith et al. 2000). Die Genomorganisation entspricht weitgehend der des HCV. Man unterscheidet Struktur (core, E1, E2) und Nichtstrukturproteine (NS2–NS5b). Die kodierenden Sequenzen des Genoms werden an beiden Enden von nicht-kodierenden Sequenzen (UTR) flankiert. Die 5'UTR enthält wie bei HCV eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) für die Proteinsynthese (siehe Abbildung 1.4) (Simons et al. 1996).

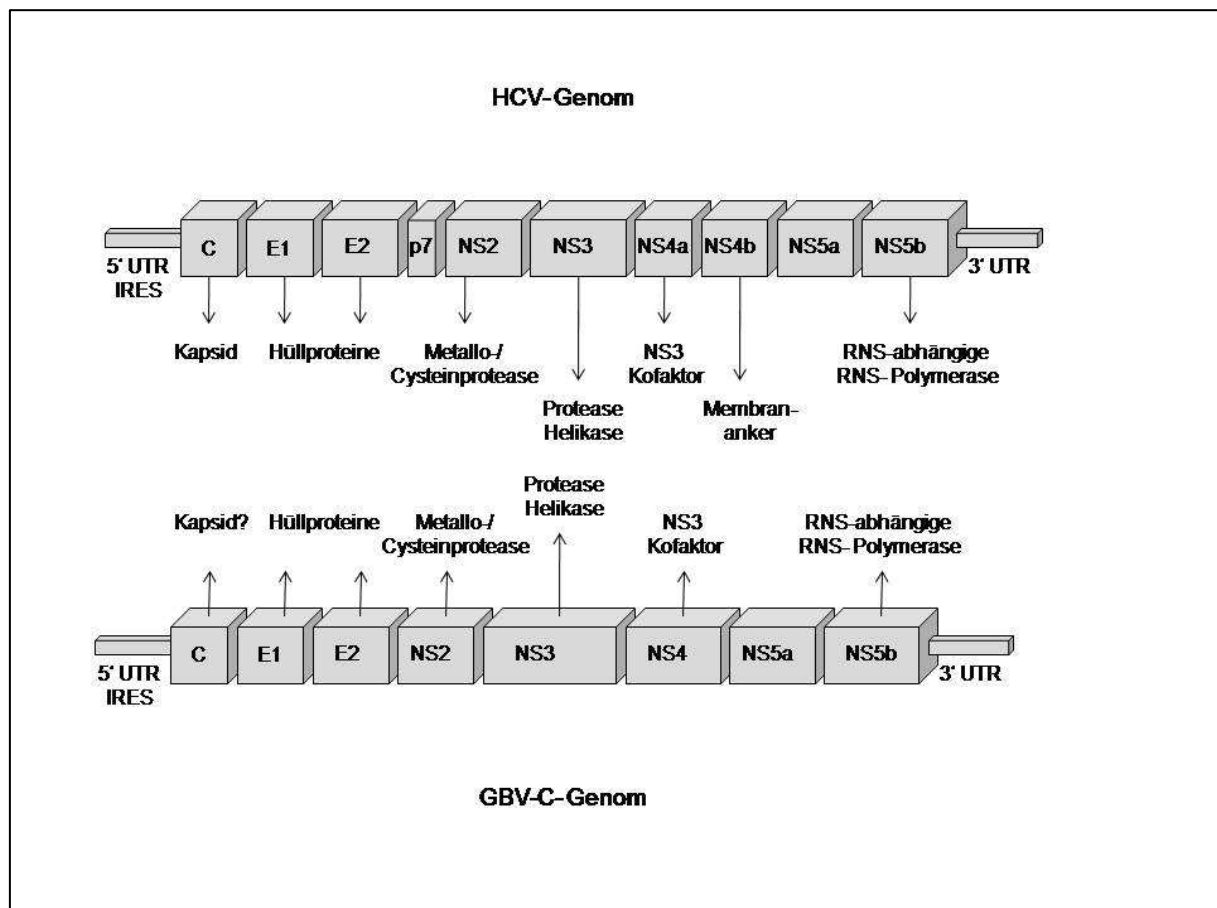


Abbildung 1.4: Vergleich der Genome von HCV und GBV-C

Die Existenz eines Core (Kapsid)- Proteins am aminoterminalen Ende wurde ursprünglich bestritten, da der offene Leserahmen bei manchen GBV-C Isolaten kurz oberhalb oder direkt mit dem E1-Protein endet. Somit fehlten in diesen Leserahmen die notwendigen, für ein Kapsid kodierenden Sequenzen. Zusätzlich wurde aufgrund von häufigen Nukleinsäurepolymorphismen am aminoterminalen Ende des offenen Leserahmens angenommen, dass es sich hierbei um keine kodierende Region handelt (Okamoto et al. 1997). Mittels biophysikalischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte jedoch die Existenz von Nukleokapsidpartikeln mit einer Größe von ca. 50nm im Plasma eines GBV-C-infizierten Patienten nachgewiesen werden. Ebenso gelang es, aus Isolaten GBV-C-infizierter Personen Antikörper gegen ein rekombinantes Peptid der Kapsid-Region zu erzeugen. (Xiang et al. 1998). Diesen Daten zufolge wird heute davon ausgegangen, dass GBV-C eine für das Kapsid-Protein kodierende Region besitzt und diese auch *in vivo* exprimiert.

Die Virushülle von GBV-C ist analog zu HCV aus zwei Virus-Hüllproteinen E1 und E2 aufgebaut. Im Unterschied zum HCV-E2 besitzt das GBV-C-E2 aber keine hypervariable Region (Zampino et al. 1999). Das NS3-Protein besitzt eine Serinprotease-Domäne, aber auch NTPase- und Helikaseaktivität. NS4 dient bei der Spaltung des Polyproteins in die Nichtstrukturproteine als Kofaktor der NS3-Protease. NS2 ist eine Zink-abhängige Metalloprotease und katalysiert die autoproteolytische Spaltung von NS2/NS3. NS5A enthält die Interferon-Sensitivitätsdeterminierende Region (ISDR). Das NS5B-Gen kodiert für die virale Replikase, eine RNS-abhängige RNS-Polymerase. (Leary et al. 1996; Smith et al. 2000).

GBV-C hat dadurch besonderes klinisches Interesse bekommen, dass in einigen Studien bei HIV-1 Infizierten eine Assoziation einer GBV-C Virämie mit einem langsameren Fortschreiten der HIV-1 Erkrankung zum Stadium AIDS und reduzierter Mortalität nachgewiesen wurde (Xiang et al. 2001; Williams et al. 2004). Dabei war der Nachweis einer GBV-C Virämie ein prädiktiver Marker für längeres Überleben unabhängig von einer vorangegangenen oder gerade erfolgenden HAART, der CD4⁺ T-Zellzahl, dem Alter, Geschlecht oder ethnischer Herkunft. Die molekularen und zellulären Mechanismen, die diesen Effekt zu Grunde liegen, sind derzeit noch unbekannt. Die Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen mit denen GBV-C die Progression der HI-Viren hemmt, könnte helfen, neue Behandlungsmethoden zu finden, die das Spektrum der derzeit vorhandenen Therapiemöglichkeiten erweitern.

1.1.2.1 Epidemiologie des GBV-C-Virus

GB Virus C (GBV-C), ein Mitglied der Flaviviridae, ist einer der engsten Verwandten des Hepatitis C Virus (HCV). Im Gegensatz zu HCV repliziert aber GBV-C nicht in Hepatozyten, sondern in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. GBV-C wird über die gleichen Transmissionswege wie HIV-1 und HCV (sexuell, vertikal und parenteral) übertragen. Bislang gibt es keine Erkrankung, die mit einer GBV-C Infektion im Menschen assoziiert werden konnte.

Die Infektion mit GBV-C ist eine relativ häufige Infektion mit einem weltweiten Vorkommen. Zwischen 1% und 4% der gesunden Blutspender sind mit dem GBV-C Virus infiziert und haben nachweisbare Mengen viraler RNS im Serum (Moaven et al. 1996; Stapleton 2003). In der Mehrheit der Fälle wird die Infektion erfolgreich vom Immunsystem eliminiert, und das Verschwinden der viralen RNS geht mit der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen das virale Hüllprotein E2 von GBV-C einher.

Die Koinfektionsrate von HIV und GBV-C liegt, je nach vorliegender Studie, zwischen 14%-55%, wobei die Prävalenz bei homosexuellen Patienten und Patienten mit intravenösem Drogenmissbrauch höher ist (Tillmann et al. 2001b).

1.1.2.2 Die verschiedenen Genotypen von GBV-C

Wie bei dem Hepatitis C Virus können GBV-C Genotypen unterschieden werden, die geographisch unterschiedlich verteilt sind. Phylogenetische Analysen zeigen eine Verteilung auf 5 Hauptgruppen: Genotyp 1 in West-Afrika, seltener in Nordamerika und Europa, Genotyp 2 in Nordamerika und Europa, Genotyp 3 in Ostasien und Südamerika, Genotyp 4 in Südostasien und Genotyp 5 in Südafrika (Muerhoff et al. 2003; Schleicher et al. 2003).

1.2 Die GBV-C und HIV-Koinfektion

Aufgrund der Gemeinsamkeiten bei der Transmission existiert eine größere Anzahl an Patienten, die sowohl mit HIV, als auch mit dem GBV-C infiziert sind. Im Unterschied zu einer HCV Koinfektion, die sich nachteilig auf den Verlauf der HIV-Infektion auswirkt, mehren sich seit 1998 Berichte, die mit einer GBV-C Koinfektion eine reduzierte Morbidität und Mortalität von HIV infizierten Patienten in Verbindung bringen. Toyoda et al. untersuchten eine Gruppe von 41 Hämophilen (davon 11 GBV-C-RNS positiv), die sich alle 1983 mit HIV infizierten.

Es zeigte sich, dass die GBV-C positiven Patienten eine geringere mittlere Viruslast ($3,53 \times 10^4$ Kopien/ml versus $5,76 \times 10^4$ Kopien/ml) und einen verlangsamten Progress ihrer HIV-Infektion aufwiesen (Toyoda et al. 1998).

Heringlake und Kollegen untersuchten den Krankheitsverlauf von 197 HIV-positiven Patienten. Von diesen waren 33 (16,8%) GBV-C RNS positiv, 112 (56,9%) wiesen Antikörper gegen das Hüllprotein E2 auf, und bei 52 (26,4%) fanden sich keine Hinweise auf eine GBV-C Infektion (Heringlake et al. 1998). Es zeigte sich, dass Patienten mit positivem Nachweis von GBV-C RNS später an AIDS erkrankten und deutlich länger lebten als Personen ohne Hinweise auf eine GBV-C Infektion. Diese Assoziation blieb auch dann bestehen, wenn die Analysen stratifiziert nach Alter oder Anzahl der $CD4^+$ T-Lymphozyten durchgeführt wurden. Ein Überlebensvorteil fand sich selbst bei Patienten, die bereits eine AIDS definierende Erkrankung erlitten hatten.

In einer Serokonverterstudie an 95 HIV infizierten Patienten untersuchten Lefrere et al. die Effekte einer GBV-C Koinfektion auf den Krankheitsverlauf von HIV. In Abständen von je drei und fünf Jahren nach der Entwicklung der spezifischen Antikörper gegen HIV wurde die mittlere HI-Viruslast und die mittlere $CD4^+$ T-Zellzahl bestimmt, und es wurde bei den GBV-C koinfizierten Patienten zu beiden Zeitpunkten eine signifikant niedrigere HI-Viruslast und nach fünf Jahren auch eine signifikant höhere $CD4^+$ T-Zellzahl beobachtet. Die GBV-C koinfizierten Patienten unterschieden sich ebenfalls in ihrem klinischen Verlauf von den HIV monoinfizierten Patienten. So wiesen bei Studienende 62% der GBV-C koinfizierten Patienten, jedoch nur 20% der HIV monoinfizierten Patienten, keine klinischen Symptome einer HIV Infektion auf, und die Überlebensrate der GBV-C koinfizierten Patienten war mit 100% deutlich höher, als die der HIV monoinfizierten Patienten (47%) (Lefrere et al. 1999).

Signifikant höhere $CD4^+$ T-Zellzahlen konnten Yeo et al. bei GBV-C koinfizierten Patienten in einer Studie mit 131 hämophilen HIV-Patienten beobachten. Diese Patienten hatten zudem ein geringeres Risiko, an AIDS zu erkranken. (Yeo et al. 2000).

Tillmann et al. fanden eine inverse Korrelation zwischen der GBV-C und der HIV Viruslast; keine Korrelation fand sich hingegen zwischen der Höhe der GBV-C Viruslast und der Menge der $CD4^+$ T-Lymphozyten (Tillmann et al. 2001a).

In einer weiteren Arbeit waren von 362 HIV infizierten Patienten 144 (39,8%) GBV-C RNS positiv. Von diesen verstarben während des Beobachtungszeitraums 41 (28,5%) im Vergleich zu 123 von 218 (56,4%) Patienten, die GBV-C RNS negativ waren.

In der Cox-Regressionsanalyse zeigte sich für Patienten ohne GBV-C Infektion nach Berücksichtigung von Parametern wie antiretrovirale Therapie, initiale Anzahl der CD4⁺ T-Zellen, Alter, Geschlecht, Rasse und Übertragungsmodus ein um den Faktor 3,7 ($p < 0,05$) erhöhtes Risiko, an den Folgen der HIV Infektion zu sterben (Xiang et al. 2001).

Williams et al. konnten 2004 signifikant höhere CD4⁺ T-Zellzahlen bei GBV-C koinfizierten Patienten in einer Studie an HIV infizierten Männern beobachten. Zudem bestätigten sich die besseren Überlebensraten chronisch mit GBV-C koinfizierter Patienten, während eine Ausheilung der GBV-C Koinfektion mit der schlechtesten Prognose assoziiert war (Williams et al. 2004).

Diesen Untersuchungen stehen allerdings einige wenige Studien gegenüber, welche den positiven Einfluss der GBV-C Infektion nicht bestätigen bzw. in denen sogar negative Effekte der Koinfektion festgestellt wurden.

Die Arbeitsgruppe um Brust konnte in einer Studie mit 180 HIV-Patienten keinen positiven Effekt des GB Virus C auf den Verlauf der HIV Infektion feststellen. So waren die HIV Viruslasten zwischen GBV-C koinfizierten und HIV monoinfizierten Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Zudem zeigten GBV-C koinfizierte Patienten am Studienende ein erhöhtes Mortalitätsrisiko gegenüber HIV monoinfizierten Patienten (Brust et al., 2002).

Quiros et al. konnten keinerlei Unterschiede zwischen GBV-C koinfizierten und HIV monoinfizierten Patienten bezüglich der Anzahl von Todesfällen, dem Auftreten von AIDS-definierenden Erkrankungen und der CD4⁺ T Zellzahl feststellen (Quiros-Roldan et al. 2002).

In einer neueren Studie von Van der Bij et. al. zeigten sich in der Gruppe mit GBV-C Virämie zwei Jahre nach HIV Serokonversion niedrigere CD4⁺ T-Zellzahlen und eine beschleunigte Krankheitsprogression im Vergleich zu den GBV-C RNS negativen Patienten. Dieser Effekt kehrte sich allerdings im Verlauf der Studie um, und ca. 8 Jahre nach Beobachtungsbeginn zeigten die Patienten mit persistierender GBV-C Virämie ein geringeres Risiko, an AIDS zu erkranken und eine geringere Mortalität (Van der Bij et al. 2005).

Ebenfalls keinen Effekt der GBV-C Koinfektion auf klinische Parameter wie HIV Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl und den klinischen Verlauf einer HIV Infektion fand sich in drei weiteren Studien von Birk, Bjorkmann und Kaye (Birk et al. 2002; Bjorkman et al. 2004; Kaye et al. 2005).

Interessanterweise wurden bei HIV/GBV-C Koinfektion inzwischen Unterschiede in der CD4⁺ T-Zellzahl in Abhängigkeit vom GBV-C Genotyp beobachtet.

Muerhoff et al. berichteten, dass HIV/GBV-C positive Patienten mit GBV-C Genotyp 2b Koinfektion höhere CD4⁺ T-Zellzahlen im Vergleich zur GBV-C Genotyp 2a Koinfektion aufwiesen (Muerhoff et al. 2003).

Weiterhin wurde bei einem Kollektiv HIV-1/HCV koinfizierter Patienten mit zusätzlicher GBV-C Genotyp 2 Koinfektion eine signifikant höhere CD4⁺ T-Zellzahl im Vergleich zu einer GBV-C Genotyp 1 Koinfektion nachgewiesen (Schwarze-Zander et al. 2006).

Insgesamt sprechen daher die Fakten dafür, dass eine Koinfektion mit GBV-C einen unabhängigen prognostischen Faktor für den Verlauf einer HIV Infektion darstellt. Die Mechanismen, mit denen eine GBV-C Koinfektion dem Fortschreiten der HIV Infektion entgegenwirkt, sind aber bisher nicht aufgeklärt.

1.3 Hypothesen zur Interaktion von HIV und GBV-C

Da GBV-C und HIV-1 *in vitro* in den gleichen Zielzellen replizieren (George et al. 2003; Xiang et al. 2005) wird angenommen, dass beide Viren auch *in vivo* direkt miteinander interagieren. Xiang et. al konnten anhand mehrerer Studien belegen, dass eine 85 Aminosäure große Region des GBV-C-NS5a Abschnitts zu einer Inhibierung der HIV-1 Replikation in Zellkultursystemen führt (Xiang et al. 2006; Chang et al. 2007; Xiang et al. 2008). Bisher ist es weder gelungen, diese Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, noch den genauen Mechanismus zu identifizieren. Alternativ zu der direkten intrazellulären Interaktion von GBV-C und HIV-1 werden folgende indirekte Interaktionen diskutiert, die hier kurz skizziert und im Weiteren genauer besprochen werden:

- Es wird vermutet, dass GBV-C Einfluss auf die Produktion von Zytokinen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hat. Lalle et al. zeigten, dass eine Infektion mit GBV-C den IFN- γ Spiegel in HIV/GBV-C koinfizierten Patienten gegenüber HIV monoinfizierten Patienten erhöhen kann (Lalle et al. 2008). Da die Progression zum Stadium AIDS mit dem Verlust der Produktion von IFN- γ und IL-2 bei HIV monoinfizierten Patienten assoziiert ist, wäre eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt von GBV-C auf die HIV-1 Erkrankung, dass GBV-C eine Stabilisierung des Th1-Zytokinprofils bewirkt.
- Eine Interaktion zwischen HIV-1 und GBV-C ist über die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 denkbar, den beiden HIV-1 Korezeptoren. GBV-C induziert eine Sekretion von RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β , den natürlichen Liganden des Chemokinrezeptors CCR5, sowie eine Bildung von SDF-1, dem natürlichen Liganden

von CXCR4. Nach Bindung der Liganden an die Chemokinrezeptoren kommt es zur Blockierung und nachfolgender Internalisierung von CCR5 bzw. CXCR4, die dann für eine HIV-Infektion nicht mehr verfügbar sind. Die resultierende Herunterregulation von CCR5 und CXCR4, könnte bei HIV-1 Infizierten einen wichtigen Mechanismus darstellen, der die Ausbreitung von HIV-1 im Wirt hemmt.

- Es ist möglich, dass die Effekte von GBV-C auf die HIV Infektion je nach GBV-C Genotyp variieren. Solche Genotyp-abhängigen Mechanismen könnten darauf beruhen, dass GBV-C Viruspartikel je nach Genotyp unterschiedlich mit Wirtsproteinen interagieren. Von besonderem Interesse ist dabei das Tetraspanin CD81, an das das Hüllprotein GBV-C-E2 binden und dadurch die CCR5- und CXCR4-Expression regulieren kann. Ebenfalls wäre es vorstellbar, dass unterschiedliche GBV-C Genotypen zu verschiedenen Expressionsmustern der Th1 bzw. Th2 Zytokine führen. Diversität in den biochemischen Eigenschaften der verschiedenen GBV-C-E2 Proteine könnte über die oben skizzierten zellulären Veränderungen auch die diskrepanten Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung einer GBV-C Koinfektion auf eine HIV Infektion erklären.

Einen Überblick über die möglichen Interaktionen von GBV-C und HIV gibt die Abbildung 1.5.

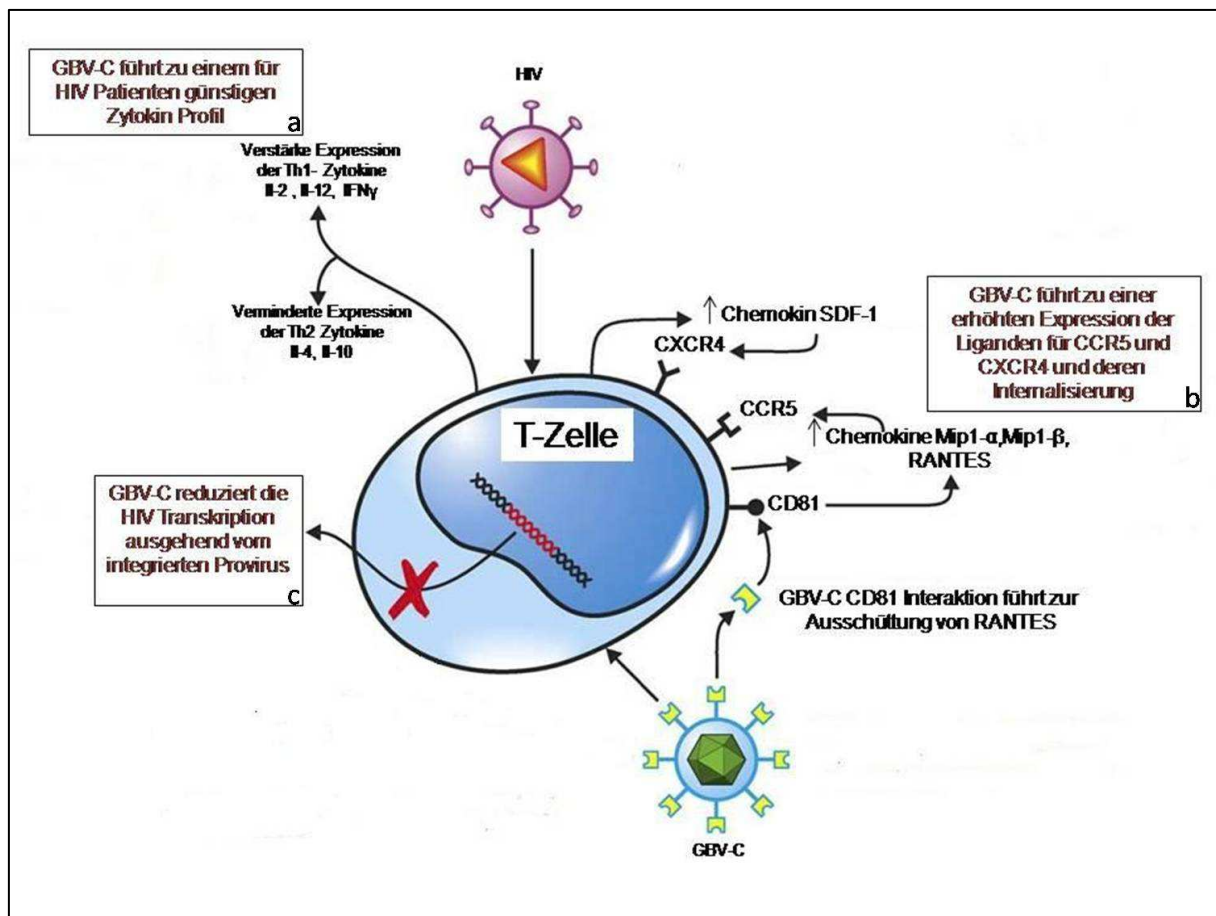


Abbildung 1.5: Übersicht über die möglichen Interaktionen von GBV-C mit HIV

- Vermutet wird, dass GBV-C zu einer verstärkten Expression der Th1 und verminderten Expression der Th2 Zytokine führt,
- über eine erhöhte Expression der β -Chemokine und RANTES eine Internalisierung der Oberflächenrezeptoren CCR5 und CXCR4 bewirkt und
- über bis dato nicht näher beschriebene Mechanismen die Replikation von HIV mittels direkter Interaktion intrazellulär zu hemmen vermag.

1.3.1 Zytokine und ihre Rolle bei der HIV bzw. GBV-C/HIV-Koinfektion

Zytokine sind Glykoproteine, die Wachstum und Differenzierung von Körperzellen regulieren. Einige Zytokine werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Viele Zytokine spielen eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen. Im Rahmen der natürlichen Immunität werden Zytokine hauptsächlich von mononukleären Phagozyten produziert (Monokine). Während der spezifischen Immuninteraktion werden weitere Zytokine von aktivierten T-Lymphozyten produziert (Lymphokine). Die Bezeichnung Interleukine umfasst die von Leukozyten gebildeten Zytokine.

Es gibt 4 Hauptgruppen von Zytokinen:

- Interferone (IFN)
- Interleukine (IL)
- Kolonie-Stimulierende-Faktoren, CSF (*colony stimulating factors*)
- Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF)

Oftmals wird ein Zytokin von unterschiedlichen Zelltypen gebildet und wirkt auch auf verschiedene Zelltypen. Teilweise werden auch ähnliche biologische Wirkungen durch mehrere Zytokine vermittelt. Diese Redundanz ist vermutlich ein Mechanismus, der eine effektive Signalübertragung sicherstellen soll. Zytokine wirken autokrin oder parakrin durch Bindung an hoch-affine Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Gegenwärtig sind mehr als fünfzig Zytokine bekannt. Zu ihren biologischen Funktionen gehören neben der Steuerung der Leukozytenontogenese (beispielsweise GM-CSF, IL-3) auch steuernde Funktionen bei der Aktivierung, Regulation von Wachstum und Differenzierung von Immunzellen nach antigenspezifischer T-Lymphozyten-Aktivierung (IL-2, IL-4). Sie spielen darüber hinaus eine Rolle als Regulatoren von Entzündungsreaktion und Wundheilungsprozessen. Eine Übersicht über die verschiedenen Zytokine ist im Anhang I. zu finden.

T-Lymphozyten unterscheiden sich je nach Differenzierung in ihrem Zytokinprofil. In Abhängigkeit vom Zytokin-Sekretionsprofil können Th1 und Th2-Antworten unterschieden werden. Th1 CD4⁺ T-Lymphozyten sezernieren vornehmlich Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ und damit Zytokine, die die Effektorfunktionen des Immunsystems (Zytotoxische T-Zellen (ZTL), NK-Zellen, Makrophagen) unterstützen. Th2-Zellen produzieren vornehmlich IL-4, IL-10, IL-5 und IL-6, also Zytokine, die eher eine humorale Immunantwort begünstigen. Es wird diskutiert, dass eine HIV spezifische Th1-Antwort protektiv wirkt, da Th1-Zytokine für die Ausbildung einer ZTL-Antwort wesentlich sind. Untersuchungen an HIV exponierten, nicht infizierten Personen haben gezeigt, dass bei diesen Menschen T-Zellen nach in vitro Stimulation mit HIV-*env*-Antigenen (gp120/gp160) und HIV-Peptiden IL-2 sezernieren, nicht aber die T-Zellen von nichtexponierten Kontrollpersonen (Clerici et al. 1992).

Auch Untersuchungen an medizinischem Personal nach Nadelstichverletzungen und an Neugeborenen HIV infizierter Mütter legen nahe, dass eine HIV spezifische Th1-Antwort eine protektive Immunantwort reflektiert. Studien an HIV-Langzeitüberlebenden weisen auch darauf hin, dass multispezifische CD4⁺ T-Lymphozyten, die IL-2 und/oder Interferon- γ produzieren, eine günstige Immunantwort gegen HIV darstellen.

Die Bedeutung der T-Helfer Zell-Antwort für den Verlauf einer HIV-Infektion wird durch Studien unterstützt, in denen die Progression einer HIV Infektion zum Stadium AIDS mit dem Verlust des Th1-Zytokinprofils korrelierte, während gleichzeitig eine erhöhte Produktion von Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10), also Th2 typische Zytokine, beobachtet wurden. Ebenso wurde von Kannanganat et. al beobachtet, dass eine Kontrolle der HIV Infektion mit der CD4⁺ T-Zell spezifischen Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF α , also einem stabilen Th1-Zytokinprofils, einhergeht (Kannanganat et al. 2007). Es gibt nun Hinweise darauf, dass die Koinfektion mit GBV-C das Zytokin Profil eines HIV-Patienten positiv beeinflussen kann:

Bei Koinfektion mit GBV-C zeigten HIV infizierte Patienten ein stabiles T-Helfer 1 Zytokinprofil (Th1), im Gegensatz zu HIV monoinfizierte Patienten (Nunnari et al. 2003). Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass HIV infizierte Patienten ohne GBV-C-Koinfektion mit der Zeit ein T-Helfer 2 (Th2) Zytokin Profil entwickelten.

1.3.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und zeichnen sich aus durch einen einheitlichen Aufbau aus sieben Transmembrandomänen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, sowie einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Die Transmembrandomänen sind aus 20–27 hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, die eine α -helikale Anordnung aufweisen (siehe Abbildung 1.6).

Aufgrund von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz werden GPCRs in mindestens sechs Familien eingeteilt, wobei die meisten der Rezeptoren der ersten Familie angehören. In der Unterfamilie 1a, zu der Geruchsrezeptoren, die adrenergen Rezeptoren und auch Rhodopsin gehören, binden kleine Liganden innerhalb der Transmembrandomänen. In der Unterfamilie 1b ist die Ligandenbindungsstelle primär in Bereichen des N-Terminus und der extrazellulären Schleifen lokalisiert. Zu dieser Familie gehören unter anderem die Chemokinrezeptoren (Bockaert et al. 1999).

Chemokinrezeptoren vermitteln die zielgerichtete Migration von Leukozyten zu Entzündungsherden. Diese Rezeptoren werden aktiviert von Chemotaxis induzierenden Zytokinen, die als Chemokine bezeichnet werden. Jedoch geht die Wirkung der Chemokine über die Induktion von Migration hinaus.

Chemokine spielen eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion, in der Hämatopoese und Angiogenese, sowie bei der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen (Menten et al. 2004).

Chemokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 7-14 kDa, die eine hochkonservierte Region mit 4 Cysteinen aufweisen, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Baggiolini 1998; Sallusto et al. 2008). Anhand der Anordnung der beiden aminoterminalen Cysteine werden Chemokine in vier Untergruppen unterteilt. Bei den CC-Chemokinen liegen die beiden Cysteine direkt nebeneinander, während sie in CXC-Chemokinen durch eine beliebige Aminosäure getrennt sind. Neben diesen beiden Hauptgruppen gibt es noch zwei kleine Chemokin-Untergruppen, die C-Chemokine mit zwei Mitgliedern und die C(X₃)C Chemokine mit bisher einem identifizierten Vertreter (Cohen et al. 1996; Mackay 2001; Viola et al. 2008).

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Chemokine gibt die Tabelle 1.2. Eine vollständige Übersicht ist in Anhang II. zu finden.

Tabelle 1.2: Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten oder beschriebenen Chemokine und deren Rezeptoren

Chemokine und ihre Rezeptoren		
Chemokine (systematischer Name)	Chemokine (ordinärer Name)	Spezifische(r) Rezeptor(en)
CXCL		
CXCL8	IL-8	CXCR1,2
CXCL 10	IP-10	CXCR3A und B
CXCL 12	SDF-1 α/β	CXCR4/CXCR7
CCL		
CCL3	MIP-1 α	CCR1,5
CCL4	MIP-1 β	CCR5, CCR1
CCL5	RANTES	CCR1,3,5

CC-Chemokinrezeptoren (CCR) sind die Rezeptoren der CC-Chemokine und anderer Chemokin-Klassen. CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR) binden ausschließlich CXC-Chemokine. Dabei kann ein Rezeptor innerhalb einer Klasse mehrere Chemokine binden. Andererseits kann ein Chemokin in der Regel mehrere Chemokinrezeptoren aktivieren (Baggiolini 1998; Sallusto et al. 2008). Neben der Klassifizierung über ihre Struktur können Chemokine und Chemokinrezeptoren auch nach funktionellen Gesichtspunkten in konstitutive und inflammatorische Chemokine eingeteilt werden.

Dabei regulieren konstitutive Chemokine die Leukozytenmigration unter physiologischen Bedingungen, während die Sekretion inflammatorischer Chemokine durch inflammatorische Zytokine induziert wird.

1.3.2.1 Die Oberflächenrezeptoren CXCR4 und CCR5

Die Oberflächenrezeptoren CXCR4 und CCR5 werden unter anderem auf den meisten hämatopoetischen Zellen sowie auf dendritischen Zellen, vaskulären Endothelzellen, Neuronen und Gliazellen exprimiert (Dragic 2001). Ihre Verteilung und Dichte auf den Zellen unterscheidet sich jedoch voneinander (Doms 2000).

CXCR4 (CD184) ist ein Glykoprotein von 352 Aminosäuren Länge (Murdoch 2000; Horuk 2001). Wie alle Chemokinrezeptoren gehört CXCR4 zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran Rezeptoren (Feng et al. 1996). Der Rezeptor verfügt über vier extrazelluläre Domänen (3 extrazelluläre Schleifen und das N-terminale Ende, siehe auch Abbildung 1.6). CXCR4 findet sich auf T- und B-Lymphozyten und monozytären Zellen, nicht aber auf Neutrophilen (Bleul et al. 1997).

Zwischen dem CXCR4-Rezeptor und seinem Liganden SDF-1 (*stromal-derived factor 1*) besteht eine „monogame“ Beziehung, das heißt, SDF-1 ist der einzige Ligand dieses Rezeptors. Dies wird durch einen identischen Phänotyp von Mäusen, bei denen entweder das Gen für SDF-1a oder CXCR4 deletiert wurde, nahegelegt (Nagasawa et al. 1996; Burger et al. 1999). Die Signaltransduktion des CXCR4-Rezeptors wird durch Bindung von SDF-1 an den N-terminalen Rezeptoranteil, sowie die ersten zwei extrazellulären Schleifen des CXCR4-Rezeptors initiiert (Crump et al. 1997).

CCR5 (CD195) ist, wie CXCR4, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembran-Domänen. Auch CCR5 ist ein Glykoprotein mit 352 Aminosäuren Länge und verfügt ebenfalls über vier extrazelluläre Domänen (3 extrazelluläre Schleifen und das N-terminale Ende) (Alkhatib et al. 1996b; Deng et al. 1996; Dragic et al. 1996).

Neben CD4- und CD8-positiven T-Zellen wird CCR5 auch auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und CD56 positiven NK-Zellen exprimiert (Premack et al. 1996; Horuk 1999). Darüber hinaus wurde CCR5 auch auf Fibroblasten, Gefäßendothelzellen, Astrozyten, Thymozyten und CD34-positiven Knochenmarkszellen identifiziert (Menten et al. 2002). CCR5 wird fast ausschließlich auf Th1-Zellen exprimiert und fehlt nahezu auf Th2-Zellen (Qin et al. 1998).

Die wichtigsten physiologischen Liganden von CCR5 sind die CC-Chemokine RANTES (*Regulated on Activation Normal T cell-Expressed and Secreted*), MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein 1 α*) und MIP1 β (*Macrophage inflammatory protein 1 β*) (Raport et al. 1996). Sechs weitere CC-Chemokine können ebenfalls an CCR5 binden:

LDP78 β (eine Isoform von MIP-1 α), MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7) und MCP-4 (CCL13) sowie Eotaxin (CCL11) (Menten et al. 2002). Die CCR5-Liganden unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Affinität gegenüber dem Rezeptor und in ihrer Potenz, eine HIV-Infektion zu inhibieren. MCP-3 wird als funktioneller Antagonist von CCR5 betrachtet, da dieses Chemokin zwar hochaffin bindet, aber kein intrazelluläres Signal zu induzieren scheint (Blanpain et al. 1999).

Die Aminosäuresequenz und der Aufbau von CCR5/CXCR4 sind in der Abbildung 1.6. dargestellt.

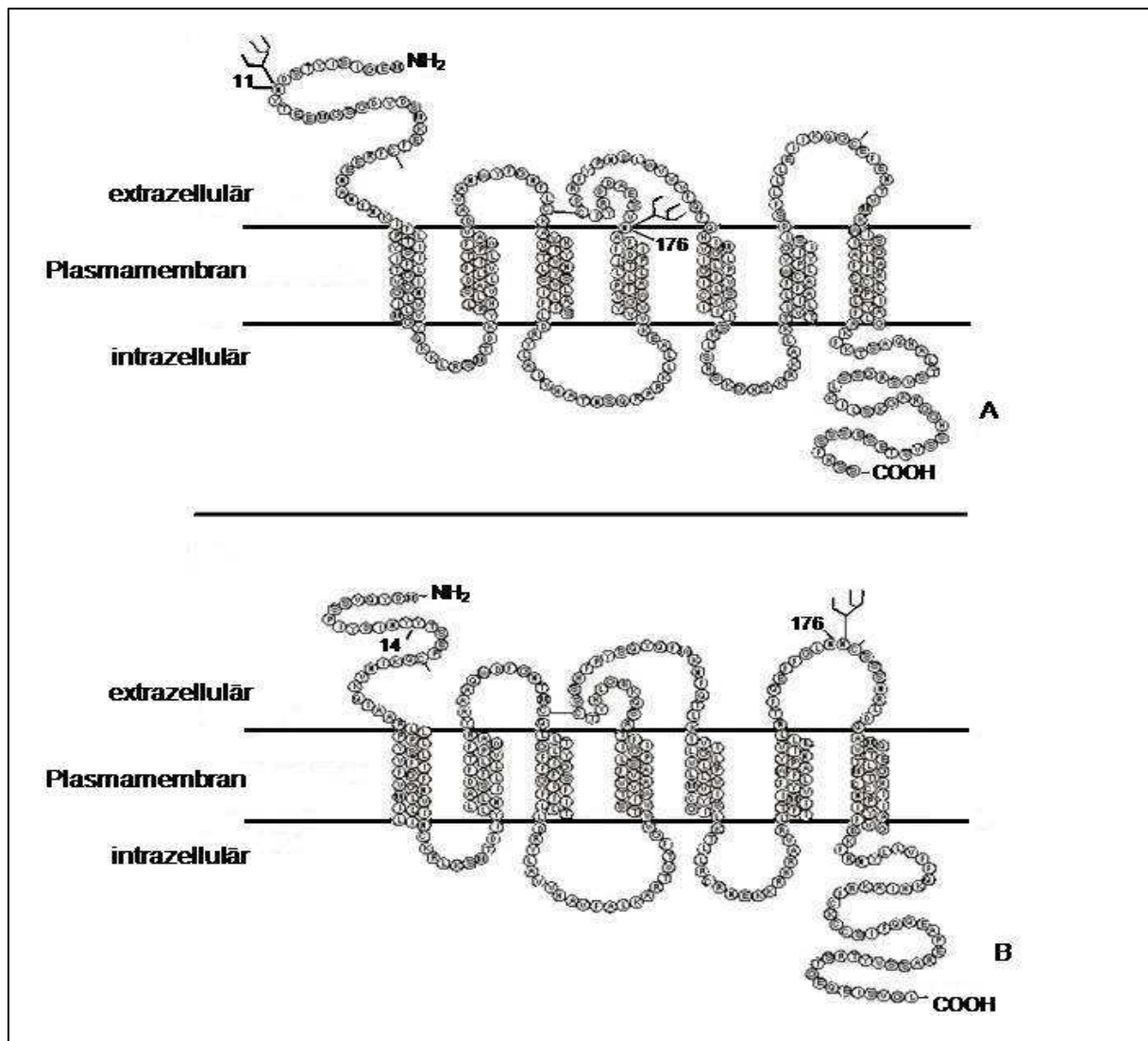


Abbildung 1.6: Graphische Darstellung der Chemokinrezeptoren (A) CXCR4 und (B) CCR5. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der HIV-Korezeptoren. Die Positionen wichtiger Aminosäurereste sind angegeben. Die an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligten Cysteinreste (C) sind durch Strichstrukturen (I) dargestellt. Die Positionen der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen sind durch Baumstrukturen dargestellt.

1.3.2.2 Die Modulation von CCR5/CXCR4 durch HIV und HIV/GBV-C-Koinfektion

Kurz nachdem CD4 als essentieller Oberflächenrezeptor für die HIV-Infektion identifiziert worden war (Dalglish 1985), konnte gezeigt werden, dass CD4 alleine für eine Infektion mit HIV nicht ausreicht. Die Expression von humanem CD4 auf Maus Zellen zeigte, dass neben CD4 für eine erfolgreiche Infektion von HIV weitere - damals unbekannte Faktoren - für eine Infektion notwendig sind (Tersmette et al. 1989; Jasin et al. 1991). 1995 konnten Cocchi et al. zeigen, dass eine Zugabe von MIP1 α , Mip1 β und RANTES die HIV-Infektion verhindern konnte (Cocchi et al. 1995).

Wenig später konnten die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 als Korezeptoren für die HIV-Infektion identifiziert werden (Alkhatib et al. 1996a; Deng et al. 1996) (siehe auch Abbildung 1.7).

Patienten mit einem raschen Verlauf scheinen eher mit Isolaten infiziert zu sein, die CXCR4 als Korezeptor benutzen (T-trope Isolate). In der Frühphase der HIV-Erkrankung finden sich dagegen meist M-trope Virusisolate, die CCR5 als Korezeptor benötigen. Die Expression dieser Korezeptoren ist außerdem vom Aktivierungszustand der CD4⁺ T-Zellen abhängig. So findet man CXCR4 insbesondere auf naiven T-Zellen, CCR5 hingegen auf aktivierten bzw. auf Effektor/Memory T-Zellen. Bei der Transmission von HIV werden vornehmlich M-trope Isolate weitergegeben, auch wenn im „Donor“ T-trope Isolate überwiegen (Weber 1989; Murakami et al. 2000; Clapham et al. 2001).

Warum M-trope Stämme effizienter bei der primären Transmission sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Fakt ist, dass 95% aller HI-Virusinfektionen auf M-trope Virenstämme zurückzuführen sind. Es existieren dazu folgende Theorien:

Langerhans-Zellen im Mukosaepithel exprimieren CCR5, aber kein CXCR4. Sie können somit nicht durch T-trope Stämme infiziert werden. Zum anderen bewirkt die Bindung von M-tropen Stämmen die Sekretion von chemotaktischen Faktoren für Makrophagen und T-Zellen und erhöht somit die Anzahl an potentiellen Zielzellen im Infektionsbereich. (Schmidtayerova et al. 1996; Izmailova et al. 2003; Lane et al. 2003; Lee et al. 2003)

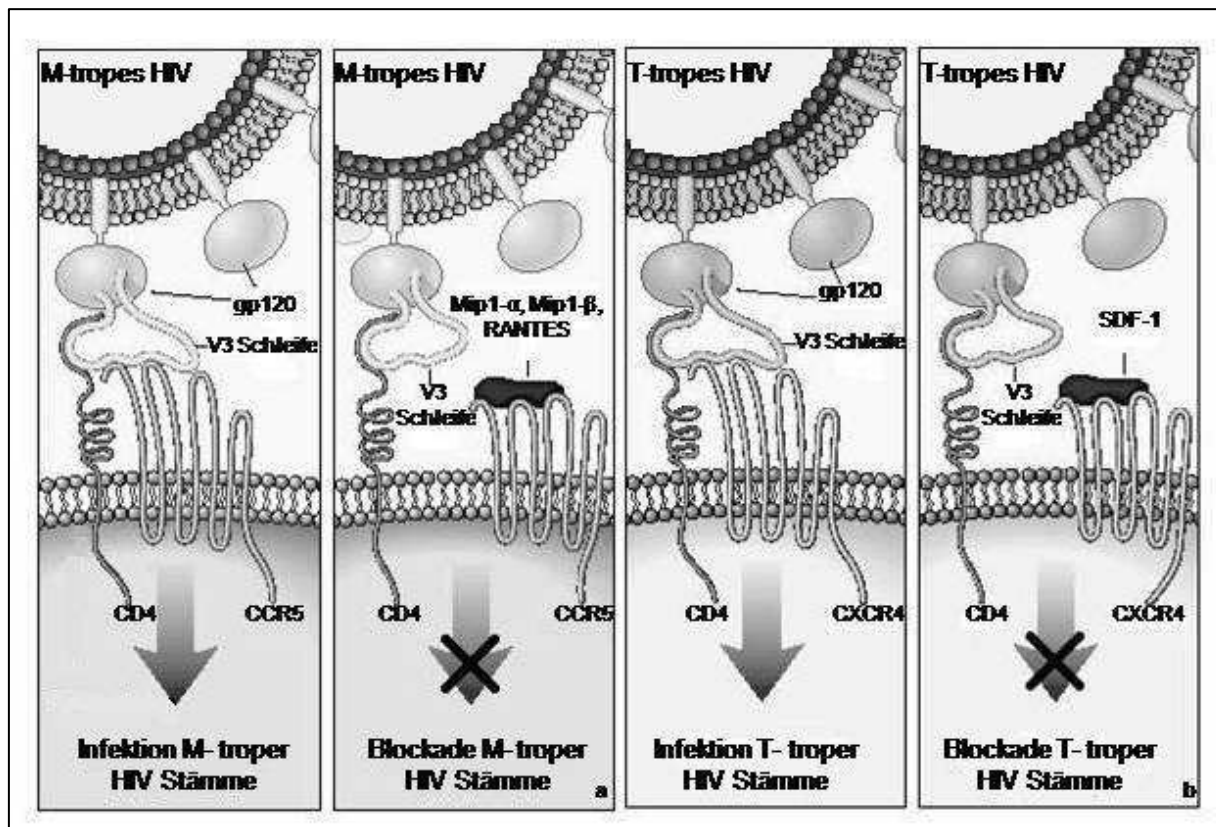


Abbildung 1.7: Infektion durch M-tropes (a) und T-tropes (b) HI-Virus und Blockade durch die Liganden der Korezeptoren CCR5 und CXCR4 (modifiziert nach Luster 1998)

Die besondere Bedeutung von CCR5 für die HIV-Infektion wurde durch einen genetischen Polymorphismus erkannt. Individuen, die homozygot für ein CCR5- Δ 32-Defektallel sind, können nur einen trunkierten Rezeptor bilden, der nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Diese Merkmalsträger sind fast vollständig vor einer HIV-1 Infektion geschützt, da M-trope Isolate, die hauptsächlich für die Übertragung des Virus bei der Erstinfektion verantwortlich sind, keine Korezeptoren auf den Zielzellen vorfinden (Liu et al. 1996; Samson et al. 1996; Benkirane et al. 1997; Xiao et al. 2000). Der Schutz von Individuen vor einer HIV-Infektion, die keinen funktionellen CCR5 exprimieren, hat CCR5 zu einem wichtigen Ansatzpunkt für eine neue Klasse antiviraler Pharmaka, sogenannter CCR5 Antagonisten, gemacht (Nansen et al. 2002). Analog zu CCR5 könnte die Herunterregulation oder Blockierung von CXCR4 die Infektionsrate von T-tropen Stämmen verringern und somit T-Zellen vor Infektion mit T-tropen HIV-Isolaten schützen (Copeland 2006; Kopetzki et al. 2008).

In einer *in vitro* Studie von Xiang et al. konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Infektion von PBMCs mit GBV-C zu einer Reduktion der Replikation von HIV-Isolaten führt, die CCR5 oder CXCR4 als Korezeptoren für die Infektion von T-Zellen benutzen.

Bei diesen Experimenten führte GBV-C zu einer vermehrten Expression von RANTES, MIP-1a, MIP1b, den natürlichen Liganden für CCR5 und SDF-1, dem einzig bekannten Liganden für CXCR4. Die Bedeutung dieser Chemokinliganden wurde weiterhin dadurch belegt, dass die Hemmung der HIV-Replikation durch GBV-C nach Zugabe von Antikörpern gegen die Chemokine RANTES, MIP1a, MIP1b und SDF-1 blockiert werden konnte (Xiang et al. 2004).

Analog konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus zu einer verminderten Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 führt (Lichterfeld et al. 2002). Für das Hüllprotein E2 des Hepatitis-C-Virus konnte weiter gezeigt werden, dass es an CD81 bindet und eine Vielzahl zellulärer Funktionen beeinflusst (Pileri et al. 1998; Wack et al. 2001; Crotta et al. 2002; Tseng et al. 2002). CD81 ist ein auf allen Lymphozyten vorkommendes Trans-Membranprotein aus der Tetraspanin-Familie, das unter anderem bei der Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Degranulation und Aktivierung von Immunzellen involviert ist (Maecker et al. 1997; Pileri et al. 1998; Crotta et al. 2002; Maecker 2003).

Die CD81/HCV-E2 Bindung induziert eine Sekretion von RANTES, einem der natürlichen Liganden des Chemokinrezeptors CCR5. Durch die Bindung von RANTES an CCR5 wird der Rezeptor blockiert und internalisiert (Nattermann et al. 2004).

Analog zur CD81/HCV-E2 Bindung wurde auch eine Interaktion zwischen CD81 und dem GB-Virus-C gefunden. Auch hierbei führt eine Bindung des GB-Virus C (GBV-C) E2 Hüllproteins an CD81 zur Induktion von RANTES und anderen β -Chemokinen, wie MIP-1 α und MIP-1 β , die dann an CCR5 binden und dadurch die Oberflächenexpression von CCR5 reduzieren. Auch die Expression von SDF-1 war dabei erhöht. Somit besteht die Möglichkeit, dass eine Infektion mit GBV-C zu einer reduzierten Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 führt, die eine Infektion und die Progression einer HIV-Infektion beeinflussen könnten (Nattermann et al. 2003).

1.4 Ziele der Arbeit

Die Auswirkungen einer GBV-C-Koinfektion auf den Krankheitsverlauf HIV infizierter Patienten wurden in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Während die meisten Studien den protektiven Effekt einer GBV-C-Koinfektion bestätigen, konnte in einigen wenigen Arbeiten eine positive Auswirkung der GBV-C-Koinfektion auf den Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der relativ geringen Größe bzw. der geringen ethnischen Diversität der untersuchten Kohorten konnten einige wichtige Aspekte, wie die möglichen Effekte der GBV-C-Viruslast, das Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern, einer Koinfektion mit unterschiedlichen GBV-C-Genotypen und die Auswirkungen der HAART-Therapie in den bisherigen Arbeiten nur eingeschränkt berücksichtigt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, an einer großen HIV-1 Population die Hypothese zu prüfen, dass eine GBV-C-Koinfektion einen positiven Effekt auf ausgesuchte klinische Parameter unter besonderer Berücksichtigung der HAART, der GBV-C-Viruslast, dem Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern und der unterschiedlichen GBV-C-Genotypen hat.

Als erstes sollte eine epidemiologische Studie an einer großen HIV-1 Population durchgeführt werden, die sich aus zwei europäischen HIV-Kohorten zusammensetzt. Hierbei sollten bei HIV infizierten Patienten mit GBV-C-Koinfektion Unterschiede im Verlauf zwischen ausgeheilten und persistierender, replikativer Infektion überprüft und der Einfluss der verschiedenen Genotypen auf die HIV-Viruslast, die absolute CD4⁺-T-Zellzahl, das Auftreten opportunistischer Infektionen und die CDC-Stadien untersucht werden.

Als nächstes Ziel dieser Arbeit sollten an einer Patientenstichprobe aus der Studienkohorte molekulare Untersuchungen zur möglichen Interaktion von GBV-C mit HIV durchgeführt werden, die zur Aufklärung möglicher Effekte einer GBV-C-Koinfektion auf die klinischen Parameter bei HIV-Infektion beitragen können. Hierbei sollte die Oberflächenexpression der HIV-Korezeptoren, CCR5 und CXCR4 und deren natürlichen Liganden, sowie der Serumspiegel verschiedener ausgesuchter Th1/Th2 Zytokine unter Berücksichtigung der GBV-C-Viruslast, dem Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern und den einzelnen GBV-C-Genotypen untersucht werden.

Abschließend sollte das für die Virus-Zielzell-Interaktion essentiell gehaltene GBV-C-E2 Protein auf Genotyp-abhängige Unterschiede in der Aminosäuresequenz hin analysiert werden, um Hinweise für die Erklärung möglicher Genotyp-abhängiger Effekte der GBV-C-Koinfektion zu finden.

Diese Untersuchungen sollen die Frage klären, ob und inwiefern eine GBV-C-Koinfektion Einfluss auf den klinischen Verlauf einer HIV-Infektion hat und ob sich dieser Einfluss auf bestimmte Pathomechanismen zurückführen lässt. Auch sollten der GBV-C-Genotyp, das Vorhandensein von GBV-C-E2 Antikörpern und die GBV-C-Viruslast als mögliche Einflussfaktoren gesondert betrachtet werden.

2 Material

2.1 Reagenzien zur Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

- QIAamp DNS Blood Mini Kit Fa. Qiagen, Hilden
- QIAamp Viral RNS Mini Kit Fa. Qiagen, Hilden
- RNeasy Mini Kit Fa. Qiagen, Hilden
- QIAquick™PCR Purification Kit Fa. Qiagen, Hilden
- β-Mercaptoethanol Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Ethanol, absolut Fa. MERCK, Darmstadt
- Nukleasefreies, steriles Wasser (Ampuwa) Fa. Fresenius AG, Bad Homburg

2.1.1 Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese

- 50 bp O'GeneRuler™ DNS Leiter Fa. Fermentas,
- 50 x TAE (Tris Acetat EDTA) – Puffer
(pH = 8,5):
 - 242 g TrisAminohydroxymethan Fa. Sigma, Deisenhofen
 - 57,1 ml Eisessig Fa. MERCK, Darmstadt
 - 100 ml EDTA (0,5 M) Fa. Sigma, Deisenhofen
 - ad 1000 ml Aqua bidest
- Gel-Ladepuffer (50 ml) :
 - 12,5 ml Ficoll 400 Fa. Biochrom Seromed, Berlin
 - 5 ml Bromphenolblau-Lsg. (0,25%) Fa. MERCK, Darmstadt
 - 32,5 ml Aqua bidest
- Agarose Fa. Gibco BRL, Eggenstein
- Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) Fa. Gibco BRL, Eggenstein

2.2 Reagenzien für den Nachweis von GBV-C

- RNase freies H₂O Fa. Qiagen, Hilden
- Quanti Tec RT Mix Fa. Qiagen, Hilden
- QuantiTec SYBR Green RT-PCR Kit Fa. Qiagen, Hilden
- GBV-C Primer Fa. TIB Molbiol, Berlin

2.2.1 Primer für die GBV-C RT-PCR und „Nested“-PCR

Name	Primersequenz	Nukleotidposition in der GBV-C 5'UTR
EP-1	5'-ATG CCA CCC GCC CTC ACC CGA A-3'	-20 bis -41
EP-2	5'-AAA GGT GGT GGA TGG GTG ATG-3'	-447 bis -427
IP-3	5'-CCC CAC TGG TCY TTG YCA ACT C-3'	-152 bis -173
IP-4	5'-AAT CCC GGT CAY AYT GGT AGC CAC T-3'	-407 bis -383

Die Positionen der Primer beziehen sich auf die Referenzsequenz mit dem Genbank-Zugangscodex: AY196904. Hierbei wird ausgehend von der ersten Position des Startcodons der GBV-C-Translation gezählt (Position 514-516) (Smith et al. 1997). Die Primer EP-1 und EP-2 werden in der ersten RT-PCR eingesetzt; die inneren Primer IP-3 und IP-4 in der anschließenden „Nested“-PCR. Abbildung 2.1 zeigt die Lage der Primer in der 5'UTR.

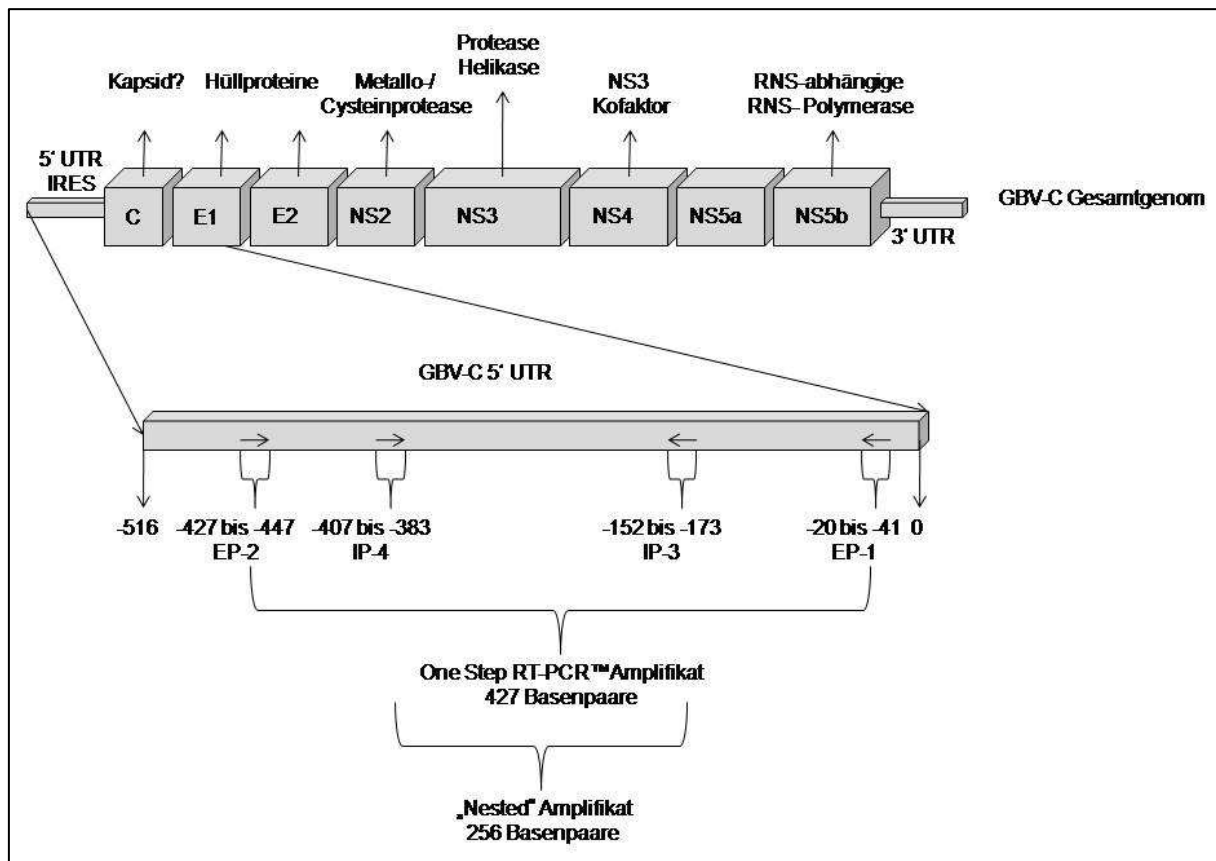


Abbildung 2.1: Lage der RT-PCR und Nested PCR Primer im GBV-C-Genom und die daraus resultierenden Amplifikate. In der RT-PCR wird eine 427 Basenpaar große Sequenz der 5'UTR und in der „Nested“ PCR eine 256 Basenpaar große Sequenz der 5'UTR amplifiziert.

2.2.2 Primer für die RT-Echtzeit-PCR zum Nachweis von GBV-C

Name	Primersequenz	Nukleotidposition in der GBV-C 5' UTR
374for	5'-TAT CCG GCG AGT TGA CAA GG-3'	-181 bis -162
486rev	5'-CCG CCG CGG AGC TGG GTG G-3'	-51 bis -69

Die Positionen der Primer beziehen sich auf die Referenzsequenz mit dem Genbank-Zugangscode: AF12195. Hierbei wird ausgehend von der ersten Position des Startcodons (Position 555-557) der GBV-C Translation gezählt. Abbildung 2.2 zeigt die Lage der Primer in der GBV-C 5'UTR.

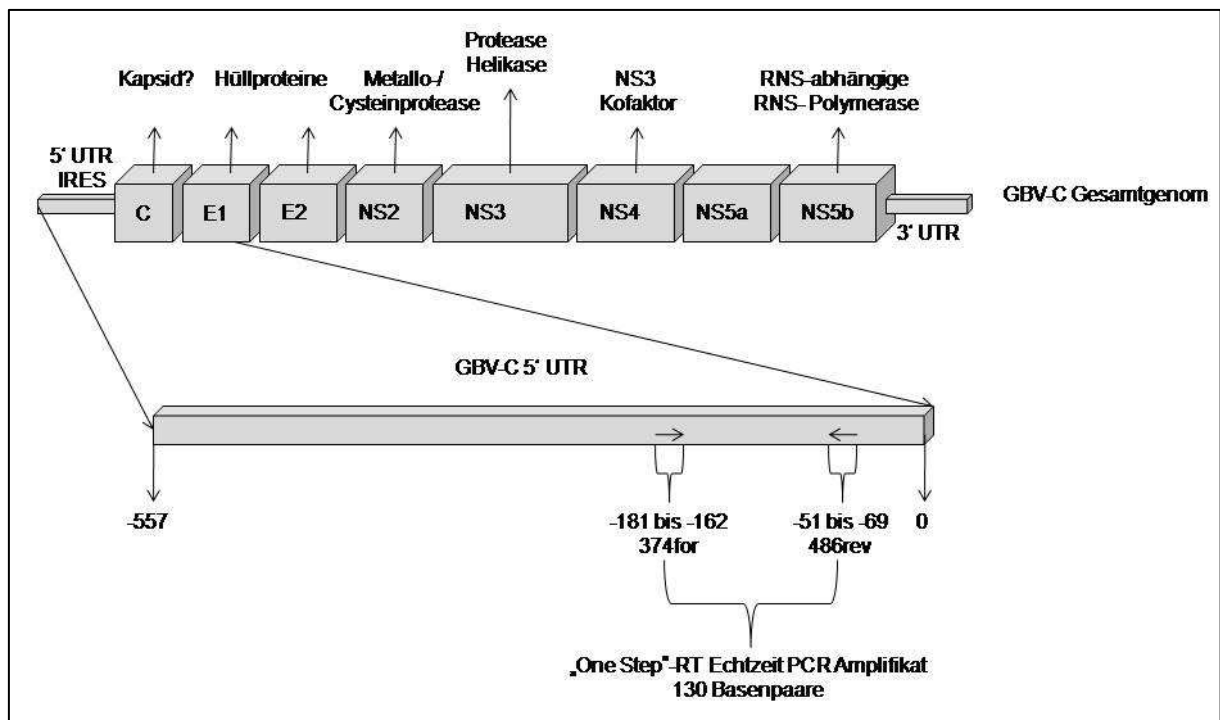


Abbildung 2.2: Lage der RT-Echtzeit-PCR Primer im GBV-C-Genom und das daraus resultierenden Amplifikat. In der RT-Echtzeit-PCR wird eine 130 Basenpaar große Sequenz der 5'UTR amplifiziert.

2.3 Primer für die Sequenzierung der GBV-C-E2 Region

Name	Primersequenz	Position im GBV-C-E2-Gen
E2F1con	5'-TGG GAA AGT GAG TTT TGG AGA TGG-3'	418-441
E2-F3a	5'-AAC CCA AAC GTC CCG GTG GGA GGC T-3'	1361-1385
E2startF1	5'-ATG GCG GGG ATG TCG CAA GGC G-3'	601-622
E2seqAR	5'-ACC AAA CTC CAC ACA TCG ATC-3'	954-973
E2seqAF	5'-GAT CGA TGT GTG GAG TTT GGT-3'	954-973
E2F2a	5'-CCG ATC TTG GTC ATG GTG TAG GA-3'	1297-1319
E2-F1	5'-GGY AAY CCG GTG CGG TCV CCC YTG C-3'	1263-1288
E2-R1	5'-GCC TCH GCC AGC TTC ATC AGR TA-3'	1669-1691
E2-F2	5'-TCC TAC RCC ATG ACC AAR ATC CG-3'	1297-1319
E2-R2	5'-AAA YAC AAA RTC CAR VAG CAR CCA-3'	1636-1659

Die Positionen der Primer beziehen sich auf die Referenzsequenz mit dem Genbank-Zugangscode: U36380. Hierbei wird ausgehend von der ersten Position des Startcodons (Position 524-526) der GBV-C-Translation gezählt. Abbildung 2.3 zeigt die Lage der Primer im GBV-C-E2 Gen.

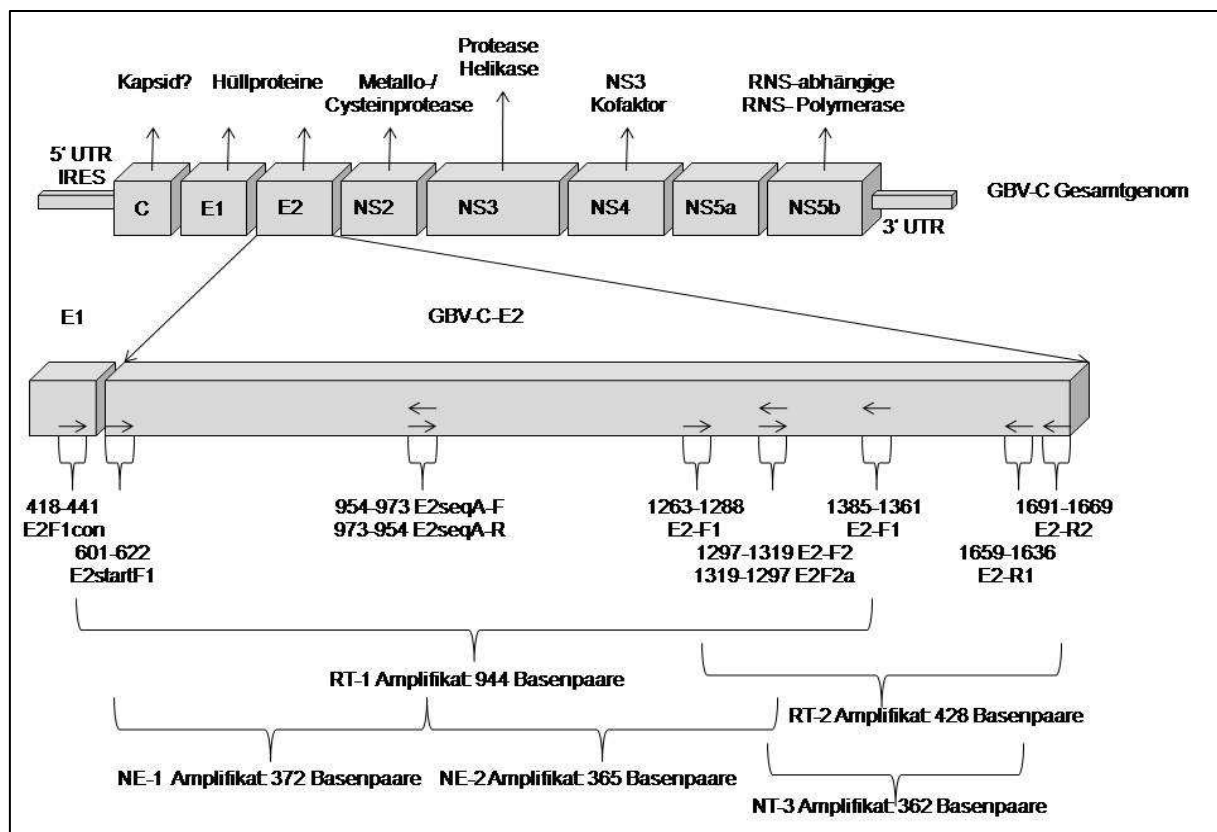


Abbildung 2.3: Lage der RT-PCR und „Nested“ Primer für die Sequenzierung des GBV-C-E2 Gen im GBV-C-Genom und die daraus resultierenden Amplifikate.

2.4 Reagenzien für die CCR5-Genotypisierung

- Q-Solution Fa. Qiagen, Hilden
- LightCycler™ FastStart DNS Master^{Plus} Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SYBR[®] Green I
- LightCycler™ Capillaries Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Primer Fa. TIB Molbiol, Berlin

2.4.1 Primer für die CCR5-Genotypisierung mit SYBR-Green I

Name	Primersequenz	Position im CCR5 Gen
583for	5'-ACC TCG AGC TCT CAT TTT CC-3'	602-583
664rev	5'-CCA GCC CCA AGA TGA CTA TC-3'	645-664

2.4.2 Reagenzien für die Separation von peripheren Blutlymphozyten

- Ficoll (D=1,077 g/cm³) Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn
- RPMI 1640 Medium+ Glutamin Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria

2.4.3 Reagenzien für die Kultivierung von peripheren Blutlymphozyten

- RPMI 1640 Medium+Glutamin Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria
- FCS (Fetales Kälberserum) Fa. PAA Laboratories, Pasching, Austria
- BSA Fa. Sigma, Deisenhofen

2.5 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

- Anti CD4 FITC Klon Sk3 Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Anti CD8 PE Klon SK1 Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Anti CD3 PerCP Klon SK7 Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Anti CCR5 APC Klon 2D7 Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Anti CXCR4 APC Klon 12-G5 Fa. BD PharMingen, Heidelberg
- Isotypkontrolle PerCP Mouse IgG₁ Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Isotypkontrolle PE/APC Mouse IgG_{2a} Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Isotypkontrolle FITC Mouse IgG₁ Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Waschpuffer (CellWash) Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Fixierlösung (CellFix) Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Lysis Puffer (BD PharmLyse™) Fa. BD Biosciences, Heidelberg

2.6 Reagenzien für die Stimulationsexperimente

- Rekombinantes GBV-C-E2-Protein
(aus CHO Zellen) Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
- Anti-GBV-C-E2 monoklonal
vom Schaf Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
- Anti-GBV-C-E2 polyklonal
aus GBV-C monoinfiziertem Serum Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
- PBS (pH 7,4) Apotheke des Universitätsklinikum Bonn
- Carbonat-Puffer (pH 9,6)
15 mM Na₂CO₃ Fa. MERCK, Darmstadt
35 mM NaHCO₃ Fa. MERCK, Darmstadt

2.7 Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, IL-12 und IFN- γ im Serum

- MIP-1 α ELISA-Kit, Serie Quantikine Fa. R&D Systems, Wiesbaden
- MIP-1 β ELISA-Kit, Serie Quantikine Fa. R&D Systems, Wiesbaden
- Human IFN- γ ELISA, Serie OptEIA™ Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Human IP-10 ELISA, Serie OptEIA™ Fa. BD Biosciences, Heidelberg
- Human IL-12 ELISA, Serie OptEIA™ Fa. BD Biosciences, Heidelberg

2.8 Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von RANTES in Zellkulturüberständen

- RANTES ELISA-Kit, Serie Quantikine Fa. R&D Systems, Wiesbaden

2.9 Reagenzien zur quantitativen Bestimmung von GBV-C-E2 Antikörpern im Serum

- μ PLATE Anti-HGenv Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.10 Sonstige Labormaterialien

- S-Monovette für EDTA Blut, 9ml Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- S-Monovette zur Serum-Gewinnung, 9ml Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen,
15ml und 50ml Fa. Greiner, Frickenhausen
- Polystyren-FACS-Röhrchen, 6ml Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
- Mikrotitterplatten (96 Vertiefungen) Fa. Nunc, Wiesbaden
- Auslaufpipetten (wattiert) 10ml, 25ml Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Einweg-Pipettenspitzen
(RNSase-frei, aerosolresistent) 10µl, 100µl,
200µl, 1000µl Fa. Biozym, Oldendorf
- Neubauer-Zählkammer improved Fa. Eich, Heidelberg
- Einweg-Handschuhe, Satin Plus Fa. Kimberly-Clark, Koblenz
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml Fa. Eppendorf, Hamburg

2.11 Geräte

LightCycler™-Instrument		Fa. Roche, Mannheim
Thermocycler	PTC 200	Fa. Biozym, Hess
	GeneAmp 9600	Fa. Perkin Elmer, Waltham, USA
Biofuge	Pico	Fa. Haereus, Osterode
Elektrophoresekammer	GNA 100	Fa. Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer	GE-D3 16	Fa. Protrans, Ketsch
Electrophoresis Power Supply	EPS 600	Fa. Pharmacia, Freiburg
Feinwaage	BP61	Fa. Sartorius, Göttingen
Mikrowellenherd		Fa. Bauknecht, Schorndorf
Heizblock	Dri-Block DB-2A	Fa. Techne, Wien
Photometer	Gene Quant	Fa. Pharmacia, Freiburg
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	Fa. Becton Dickinson, San
mit CELL Quest Software		Jose, USA
CO ₂ -Inkubator	Serie 300, 165 l	Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden
Sterilbank	Gelaire	Fa. Flow Laboratories, Meckenheim

Plattenschüttler	Typ MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen
Invers-Lichtmikroskop	Typ DM IL	Fa. Leica, Wetzlar
ELISA-Reader	Tecan Spectra Mini	Fa. TECAN/SLT, Crailheim
Vortex	Genie 2	Fa. Scientific Industries, Wien
Pipetten		Fa. Eppendorf, Hamburg
10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l		
Stickstoff-Tank	Type 250	TEC-Lab, Kalamazoo, USA

3 Methoden

3.1 Gewinnung von Nukleinsäuren

3.1.1 RNS-Extraktion

Die RNS-Extraktion erfolgte mit Hilfe des *QIAamp Viral RNA Kit*TM. Um RNasen zu inaktivieren und die Isolierung intakter RNS zu gewährleisten, wird die Probe zunächst unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert. Hierzu dient der speziell von der Firma Qiagen entwickelte Puffer AVL. Das Verfahren der RNS-Extraktion beruht auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an eine Silicagel-Matrix in Gegenwart von chaotropen Salzen. Durch zwei nachfolgende Waschschriffe mit den beiden im *QIAamp Viral RNA Kit*TM enthaltenen Waschpuffern AW1 und AW2 wird die RNS gereinigt und anschließend in RNase freiem Wasser oder einem geeigneten Puffer, hier der Puffer AVE, eluiert. Dieser Puffer enthält Natriumazid und verhindert somit mikrobielle Verunreinigung. Im Anschluss wurde die RNS bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Durchführung:

- 560µl Puffer AVL in ein 1,5ml Reaktionsgefäß vorlegen
- 140µl Serum zupipettieren und 15 s vortexen
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
- kurz anzentrifugieren
- 560µl Ethanol (96–100%) zum Reaktionsansatz pipettieren und 15 s vortexen
- kurz anzentrifugieren
- 630µl der Lösung auf eine *QIAamp-Spinsäule* auftragen und 1min bei 6.000g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen und restliche Lösung auftragen (1 min bei 6.000g zentrifugieren)
- Spinsäule in neues 2ml Auffanggefäß überführen und 500µl Puffer AW1 zupipettieren
- 1 min bei 6.000g zentrifugieren
- Spinsäule in neues 2ml Auffanggefäß überführen und 500µl Puffer AW2 zupipettieren
- 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Spinsäule in ein sauberes 2ml Auffanggefäß überführen und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren

- Spinsäule in ein sauberes 1,5ml-Reaktionsgefäß überführen, 40µl Puffer AVE zupipettieren und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 6.000g zentrifugieren

3.1.2 DNS-Extraktion

Die DNS-Extraktion erfolgte mit Hilfe des *Qiagen DNS Blood Mini Kit™*. Das Verfahren der DNS-Extraktion beruht dabei auf der Denaturierung von Proteinen durch Detergenzien. Die freiwerdende DNS wird mit Hilfe einer Säule (Silicagel-Matrix, die als vernetztes Polymer in einem Zentrifugenröhrchen angebracht ist) selektiv und reversibel gebunden. Die bevorzugte Isolierung chromosomaler DNS gegenüber zellulärer RNS geschieht durch Einstellen von speziellen Pufferbedingungen des hier verwendeten Lysepuffers AL. Diese wurden von der Firma Qiagen auf optimale Bindung der chromosomalen DNS an die Säule eingestellt. Der Salzgehalt und pH-Wert sind so gewählt, dass eine Kontamination der gebundenen DNS mit z.B. Proteinen unterbunden wird. Die gebundene DNS wird mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern AW1 und AW2 gereinigt und anschließend mit dem Eluationspuffer AE von der Säule gelöst. Der Puffer AE enthält EDTA zur Stabilisierung der eluierten DNS, die nun bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden kann.

Durchführung:

- 20µl Protease in ein 1,5ml Eppendorfgefäß vorlegen
- 200µl EDTA-Vollblut zupipettieren
- 200µl Puffer AL zupipettieren und 15 s vortexen
- 10 min Inkubation bei 56°C, nachfolgend 15 min bei 95°C (um potentiell infektiöse Erreger zu inaktivieren)
- 200µl Ethanol hinzugeben und erneut vortexen
- Gemisch von Schritt 3 in eine Säule (*QIAamp-Spinsäule*) überführen und für 1 min bei 6.000g zentrifugieren.
- Filtrat verwerfen
- 500µl Puffer AW1 hinzugeben und für 1 min bei 6.000g zentrifugieren.
- Filtrat verwerfen
- 500µl Puffer AW2 hinzugeben und für 3 min bei 20.000g zentrifugieren.
- Säule in ein sauberes 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführen und 50µl Puffer AE hinzugeben

- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 1 min bei 6.000g zentrifugieren.

3.2 Methoden zur Detektion des GBV-C-Virus

3.2.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („*polymerase chain reaction*“ =PCR) ermöglicht es, eine sequenzspezifische Amplifikation und Analyse von Nukleinsäuren durchzuführen (Mullis et al. 1986; Mullis et al. 1987). Das Prinzip besteht in der enzymatischen Vermehrung eines DNS-Abschnittes mittels einer Polymerase und zweier Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an komplementäre DNS-Stränge binden. Damit lässt sich binnen weniger Stunden eine große Anzahl von Kopien eines bestimmten DNS-Abschnittes herstellen. Die PCR-Reaktion besteht aus 3 Schritten, die als Zyklus zusammengefasst werden:

1. Denaturierung: Zur Erzeugung von Einzelsträngen werden die DNS-Doppelstränge bei 95°C getrennt.
2. „Annealing“: Unter Hybridisierungsbedingungen erfolgt die Anlagerung der Primermoleküle an die einzelsträngige Matrizen-DNS. Die dazu gewählte Temperatur (Annealingtemperatur) ist u.a. abhängig von Länge, GC-Gehalt und Sequenz des Primers.
3. Elongation: Die Synthese der Komplementärstränge in 5'→3'-Richtung durch eine hitzestabile DNS-Polymerase erfolgt bei 72°C.

Dieser Zyklus wird 30- bis 40-mal mittels eines sogenannten Thermocycler, der die Proben in einer programmierbaren Abfolge auf bestimmte Temperaturen aufheizt bzw. kühlt, wiederholt.

In der Regel wird für die Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNS eine Temperatur gewählt, die 5°C unter der Schmelztemperatur des Primer-Matrizen-Hybrids liegt. Eine niedrigere Annealingtemperatur erhöht zwar die Syntheserate, beeinträchtigt aber die Spezifität des Vorgangs. Die Synthese des komplementären Strangs findet bei 72°C statt. Die Dauer dieses Reaktionsschrittes wird abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Abschnittes gewählt. Als Faustregel wird eine Synthesegeschwindigkeit von ca. 1000bp pro Minute angenommen. Bei idealen Bedingungen (Amplifikationseffizienz E=1) führt jeder Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der Ziel-DNS.

Unter experimentellen Bedingungen sind für verschiedene Ziel-DNSs Amplifikationseffizienzen zwischen 0,46 und 0,99 ermittelt worden (Siebert et al. 1992). Die Amplifikationseffizienz hängt unter anderem von den Charakteristika der zu amplifizierenden Sequenz, insbesondere von den gewählten Primersequenzen ab. Länge und Basen-Zusammensetzung der Zielsequenz sind dem gegenüber nur zweitrangig (Wang et al. 1989; Siebert et al. 1992).

Nur während der frühen PCR-Zyklen findet eine annähernd exponentielle Amplifikation statt, in späteren Zyklen hingegen stellt sich der sogenannte Plateau-effekt ein. Dieser Effekt wird auf folgende Faktoren zurückgeführt:

1. Bei hohen Produktkonzentrationen konkurriert die Reassoziaton der denaturierten Stränge mit dem Anlagern der Primer (Erlich et al. 1991).
2. Das molare Verhältnis zwischen DNS-Polymerase und Ziel-DNS fällt unter einen kritischen Wert.
3. Inhibitoren wie Pyrophosphat, das beim Einbau der Nukleotide frei wird, akkumulieren im Reaktionsgefäß.
4. Eine oder mehrere der benötigten Reaktionskomponenten werden limitierend.

3.2.2 RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNS-Sequenzen amplifizieren. Da die RNS nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden kann, muss sie zunächst in einen komplementären DNS-Strang (cDNS) umgeschrieben werden (reverse Transkription). Für diese Reaktion stehen verschiedene RNS-abhängige DNS-Polymerasen, die Reversen Transkriptasen, zur Verfügung.

Bei der hier verwendeten RT-PCR finden die Reaktion für die c-DNS-Erststrangsynthese und PCR in einem Reaktionsgefäß statt. Da einer der beiden Primer in der Reaktion für die c-DNS-Erststrangsynthese und für die nachfolgenden PCR verwendet wird, sind sequenzspezifische Primer eine unabdingbare Voraussetzung für den Erfolg der RT-PCR.

Vorteil der hier verwendeten RT-PCR ist die einfache Handhabung. Ein Umpipettieren zwischen der reversen Transkription und PCR entfällt, was zudem ein vermindertes Kontaminationsrisiko bedeutet. Durch optimal aufeinander abgestimmte Komponenten können weitere Pipettierschritte eingespart werden.

So enthält der in dieser Arbeit verwendete *One-Step-RT-PCR*TM Kit der Firma Qiagen eine Enzymmischung bestehend aus zwei Reversen Transkriptasen (Omniscript und Sensiscript) und einer speziell entwickelten Hot-Start-DNS-Polymerase (*HotStarTaq*TM DNS-Polymerase). Die beiden RT-Enzyme erlauben aufgrund ihrer hohen Affinität zu RNS eine effiziente reverse Transkription. Sie decken in der gemeinsamen Verwendung einen weiten Bereich an RNS-Ausgangsmenge ab (von 1pg bis zu 2µg), da beide für unterschiedliche Ausgangsmengen optimiert sind. Das dritte Enzym des Kits, *HotStarTaq*TM DNS-Polymerase, ist eine chemisch modifizierte Taq-Polymerase, die während der relativ niedrigen Reaktionstemperatur beim RT-Schritt vollkommen inaktiv ist. Durch eine einfache 15minütige Inkubation bei 95°C im Anschluss an die reverse Transkription wird die *HotStarTaq*TM DNS- Polymerase aktiviert und gleichzeitig die beiden reversen Transkriptasen inaktiviert.

Durchführung RT-PCR:

- Ansatz des Reaktionsgemisches auf Eis
 - 10µl 5x *QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*TM
 - 2µl dNTPs (10mM)
 - 0,6µl vorwärts Primer (EP1, 50µM)
 - 0,6µl rückwärts Primer (EP2, 50µM)
 - 2µl *QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix*TM
 - 31,3µl RNase freies H₂O
- 46,5µl Reaktions-Mix in ein 200µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettieren
- 3,5µl RNS zupipettieren (zur Negativkontrolle 3,5µl H₂O)
- Reaktionsgefäße verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren

RT- PCR Program:

Reverse Transkription: 50°C für 20 min
Initiale Denaturierung: 95°C für 15 min
40 Zyklen: 94°C für 30 s, 55°C für 60 s, 72°C für 60 s
Abkühlen: 4°C bis Entnahme

Die Produkte der RT-PCR wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

3.2.3 „Nested“-PCR

Um auch kleinste Mengen (bis zu 3 Kopien) viraler RNS nachzuweisen, ist es nötig, an die initialen Amplifikationsschritte der RT-PCR eine zweite PCR anzuschließen. Dies erreicht man mit dem Einsetzen eines zweiten Primer Paares, das so entworfen und synthetisiert wird, dass beide Primer innerhalb des gewünschten Sequenzabschnittes des Amplifikationsproduktes aus der ersten Amplifikation binden. Das zweite Primer-Paar sorgt dafür, dass nur das gewünschte Amplifikat in hoher Ausbeute gebildet wird.

Durchführung „Nested“-PCR:

- Ansatz des Reaktions-Mix auf Eis
 - 5µl 10 x *Pfu* Puffer mit MgSO₄
 - 1µl dNTPs (10mM)
 - 0,6µl vorwärts Primer (IP3, 50µM)
 - 0,6µl rückwärts Primer (IP4, 50µM)
 - 0,5µl *Pfu* DNS Polymerase
 - 40,8µl Ampuwa H₂O
- 48,5µl Reaktions-Mix in ein 200µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettieren
- 1,5µl RT-PCR-Produkt zupipettieren (zur Negativkontrolle 1,5µl H₂O)
- Reaktionsgefäße verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren

PCR-Programm für die zweite Stufe der „Nested“-PCR:

Initiale Denaturierung: 95°C für 2 min
34 Zyklen: 95°C für 50 s, 55°C für 30 s, 72°C für 120 s
Abkühlen: 4°C bis Entnahme

Die Amplifikationsprodukte wurden nach Durchführung der „Nested“-PCR bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. DNS-Moleküle besitzen eine zur Länge des Moleküls proportionale negative Gesamtladung.

Sie beruht in erster Linie auf den negativen Teilladungen der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und bewirkt, dass DNS sich im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegt. Die Agarosegelmatrix dient als Molekularsieb, durch das kleine DNS-Moleküle schneller wandern können als größere. Darüber hinaus wird die Wanderungsgeschwindigkeit von der angelegten Spannung, den Pufferbedingungen, der Agarosekonzentration und der Konformation der DNS-Fragmente bestimmt. Die Visualisierung der DNS erfolgt mit Hilfe von Ethidiumbromid. Dieses kann in die DNS-Doppelhelix interkalieren und unter UV-Strahlung zur Abgabe von Fluoreszenzlicht angeregt werden.

Für die Auftrennung der DNS-Fragmente wurden 2%ige Agarosegele hergestellt.

Durchführung:

- 50ml TAE-Puffer in einen 100ml Erlenmeyerkolben geben
- 1g Agarose einwiegen und mit Magnetrührer gut durchmischen
- im Mikrowellenherd mehrmals aufkochen, bis die Agarose vollständig gelöst ist
- Lösung auf etwa 45°C abkühlen lassen
- 2,5µl Ethidiumbromid-Lösung (10µg/µl) zupipettieren
- vorsichtig durchmischen
- Lösung luftblasenfrei in den Gelträger gießen
- je 8µl der DNS-Proben mit 2µl Laufpuffer versetzen
- nach Erstarren des Gels, Proben und Längenstandard (50bp-Leiter) auftragen
- die Auftrennung erfolgt 30-45 min bei 100mA (120V) in einer Mini-Elektrophoresekammer

3.2.5 GBV-C-Status und Genotypisierung

Um den GBV-C-Infektionsstatus zu bestimmen, wurde nach Extraktion viraler RNS aus Patientenseren (siehe 3.1.1) und mittels der unter 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen RT-PCR und anschließender „Nested“-PCR ein 255 Basenpaar großer Sequenzabschnitt der 5'UTR des GBV-C-Virus amplifiziert (Muerhoff et al. 1996; Muerhoff et al. 2003; Schwarze-Zander et al. 2006) und mittels der unter 3.2.4 beschriebenen Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von GBV-C-RNS hin analysiert.

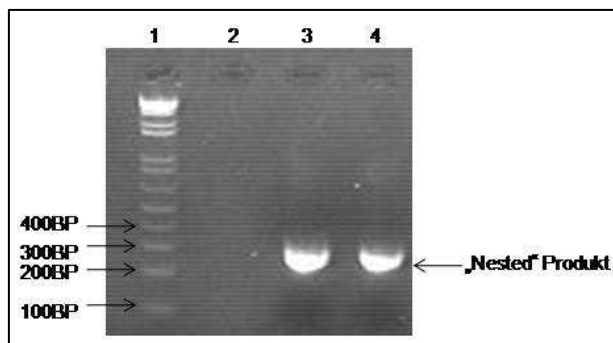


Abbildung 3.1: Agarosegel einer „Nested“-PCR. (1) Marker, (2) negativ Kontrolle, (3, 4) GBV-C positive Proben

Hierbei wurden solche Proben als positiv definiert, die eine Bande bei ca. 255 BP nach erfolgter „Nested“-PCR aufwiesen (siehe Abbildung 3.1). Die positiven Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma SeqLab, Göttingen geschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden uns als Chromatogramme und Sequenzfolgen im FASTA-Format übergeben und mit dem Sequenzanalyse-Programm Bioedit[®] analysiert.

3.3 Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR dar, die es ermöglicht, während der Amplifikation die Zunahme des Produktes zu detektieren. Die heute erhältlichen Systeme basieren in der Regel auf der photometrischen Messung von Fluoreszenz. Es gibt verschiedene Möglichkeiten reaktionsabhängig Fluoreszenz-Signale zu erzeugen. Am einfachsten ist die Verwendung von Farbstoffen wie SYBR-Green, die an doppelsträngige DNS interkalieren und fluoreszieren. Nachteilig ist hier, dass auf diese Weise generierte Signale nicht sequenzspezifisch sind und somit auch Primer-Dimere und falsche Amplifikate detektiert werden. Eine andere Möglichkeit ist z.B. die Verwendung von Fluoreszenz markierten Sonden, die unter Ausnutzung von FRET (Fluoreszenz **R**esonanz **E**nergie **T**ransfer) oder Quenching bei Vorliegen von komplementären DNS-Fragmenten ein Fluoreszenzsignal erzeugen.

3.3.1 Echtzeit-PCR mit dem LightCycler-System

Die Abbildung 3.2 zeigt einen schematischen Querschnitt durch das LightCycler-Gerät. Die Reaktionskammer und das Probenkarussell sind aus Materialien mit geringer Wärmekapazität gefertigt. Dadurch und durch das günstige Verhältnis von Oberfläche zum Volumen der Glaskapillaren können Aufheiz- und Abkühlraten von bis zu 20°C pro Sekunde erreicht werden.

Die Temperaturregulierung erfolgt über eine Heizspirale, welche die Umgebungsluft auf die entsprechende Temperatur aufheizt. Ein Ventilator am Boden der Kammer saugt die Luft über die Heizspirale an und sorgt für eine homogene Temperaturverteilung. Das Probenkarussell bietet Platz für 32 Kapillaren, welche durch einen Schrittmotor über eine Optik bewegt werden können. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt durch eine lichtemittierende Diode (470 nm) über die Spitze der Kapillare. Diese wirkt als optische Einheit und gibt die emittierte Fluoreszenz gebündelt nach unten wieder ab. Eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitet die emittierte Fluoreszenzstrahlung zum Fluorimeter weiter. Dieses wandelt das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches sofort über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt wird, so dass der Verlauf der PCR in Echtzeit am Rechner verfolgt werden kann.

Der LightCycler besitzt drei Detektions-Kanäle (F1-F3), welche Fluoreszenzen mit Wellenlängen von 530 nm (Fluorescein/SYBR-Green), 640 nm (LC-Red640) und 710 nm (LC-Red705) messen können (Bellin et al. 2001). Gelb-grüne Fluorophore wie Fluorescein oder SybrGreen können direkt durch die LightCycler-LED angeregt und ihre resultierende Emissionsfluoreszenz im Kanal F1 gemessen werden. Im Gegensatz dazu können die Fluorophore LC-Red 640 oder LC-Red 705 nur indirekt über Fluoreszenzresonanzenergietransfer angeregt werden (siehe Abbildung 3.2).

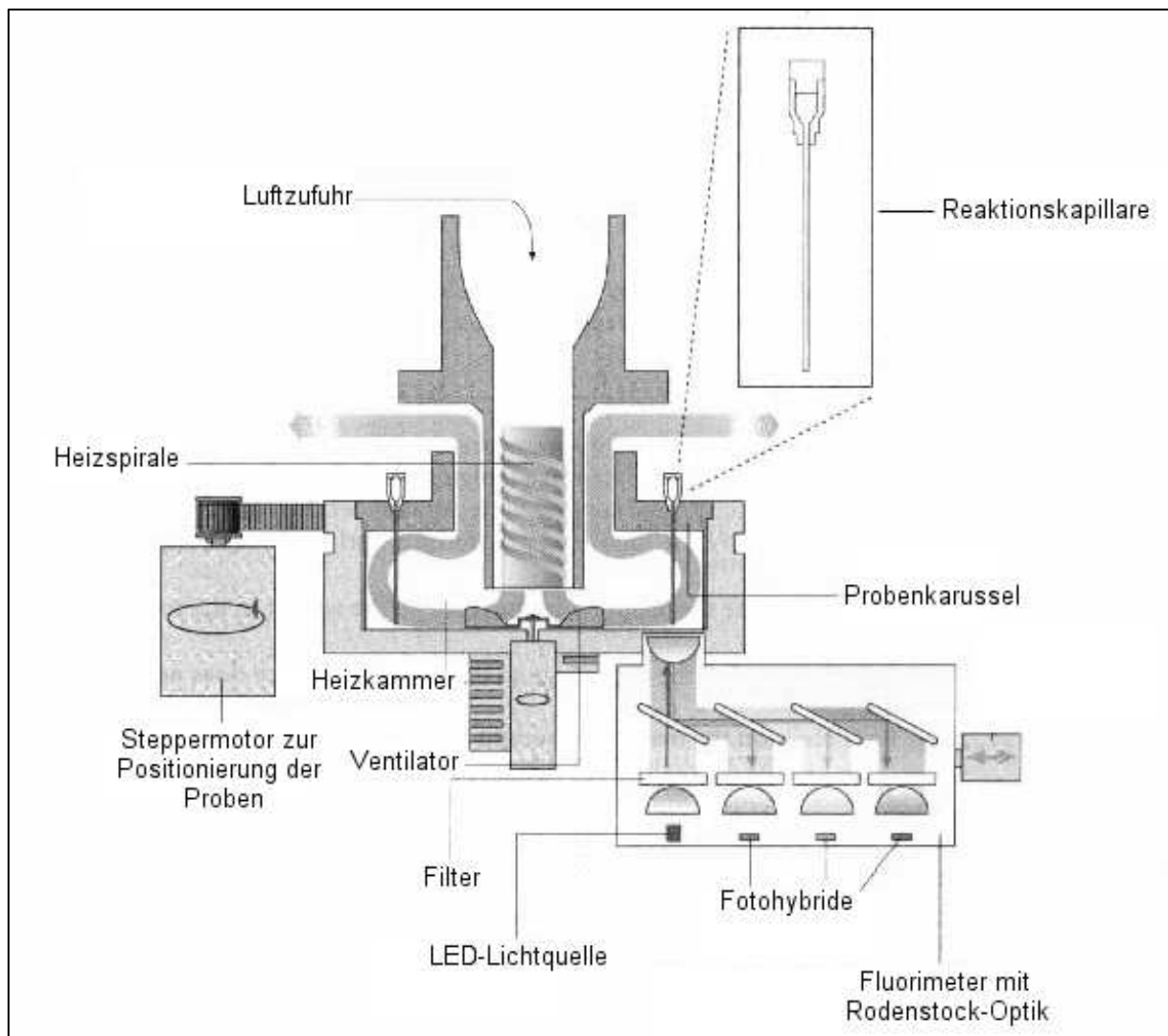


Abbildung 3.2: Schematische Übersicht des LightCycler Gerätes

3.3.2 Schmelzkurvenanalyse

Das LightCycler-System bietet die Möglichkeit, im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Die mittlere Schmelztemperatur (T_m) von doppelsträngigen DNS-Molekülen hängt in erster Linie von ihrer Nukleotidzusammensetzung ab. Da Guanin-Cytosin-Basenpaare über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, benötigt ihre Trennung gegenüber den Adenin-Thymidin-Paaren, die nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, einen höheren Energieaufwand. Ebenfalls Einfluss auf die Schmelztemperatur hat die Länge der DNS-Moleküle, sowie die Ionenzusammensetzung des Puffers (Ririe et al. 1997).

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wird bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur beginnend bei einer Temperatur zwischen 40°C und 70°C stetig um 0,1°C pro Sekunde erhöht, bis zur vollständigen Denaturierung der DNS bei 95°C. Die Auswertung der Schmelzkurve erfolgt mittels der ersten Ableitung der gebildeten Fluoreszenzkurven. Die lokalen Maxima dieser Ableitung geben die mittleren Schmelztemperaturen der entstandenen Produkte oder der verwendeten Sonden an.

3.3.3 Echtzeit-RT-PCR zum quantitativen Nachweis von GBV-C

Für die quantitative Bestimmung der GBV-C-RNS wird eine in unserem Labor etablierte Methode angewandt (Nischalke et al. 2004). Die als GBV-C-RNS positiv identifizierten Proben konnten durch eine RT-Echtzeit-PCR quantifiziert werden.

Durchführung:

- Ansatz des Reaktions-Mix auf Eis
 - 10µl 2x QuantiTec SYBR Green RT-PCR Master Mix™
 - 2µl vorwärts Primer (374for, 10µM)
 - 2µl rückwärts Primer (486rev, 10µM)
 - 0,2µl QuantiTec RT Mix™
 - 0,8µl H₂O
- 15µl Reaktions-Mix in die Kapillaren pipettieren
- 5µl RNS zupipettieren (zur Negativkontrolle 5µl H₂O)
- Kapillaren verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren

Echtzeit-RT-PCR-Programm:

Reverse Transkription: 50°C für 20 min
Initiale Denaturierung: 95°C für 15 min
40 Zyklen: 94°C für 15 s, 65°C für 20 s, 72°C für 30 s
Detektion: am Ende der Elongation bei 85°C (Detektionskanal F1)

Schmelzkurvenanalyse:

Denaturierung: 95°C für 20 s
Reassoziaton: 65°C für 20 s

Schmelzkurve: 65°C-95°C (Heizrate 0,1°C/s) bei kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz

3.4 Qualitativer Nachweis der GBV-C-E2 Antikörper mittels ELISA

ELISAs („enzyme linked immuno sorbent assay“) dienen zum spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Engvall et al. 1971a; Engvall et al. 1971b). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA Technik wird ein sogenannter Fangantikörper an einer Mikrotiterplatte immobilisiert, der das entsprechende Antigen selektiv in komplexen Proteinlösungen binden kann (Yolken et al. 1977). Die Detektion erfolgt über einen direkt oder indirekt markierten Sekundärantikörper, der gegen ein anderes Epitop als der Fangantikörper gerichtet ist. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wird an eine feste Phase hier eine spezielle 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am Fangantikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions- (*detection*)-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *horseradish*), Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener Glucoseoxidase (GOX) gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein zum Enzym passendes Substrat (*Chromogen*) zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten.

Die Antikörper gegen das GBV-C-E2 Protein treten nach Verlust der GBV-C-RNS im Serum auf (Hassoba et al. 1997; Bourlet et al. 1999). GBV-C-E2 Antikörper können über Jahre nach abgelaufener GBV-C-Infektion persistieren und sind damit ein Marker für eine abgelaufene GBV-C-Infektion.

In Einzelfällen können GBV-C-RNS und GBV-C-E2 Antikörper gleichzeitig gefunden werden. Das Vorhandensein der GBV-C-E2 Antikörper wurde in allen Patientenseren mit dem kommerziell erhältlichen *μPLATE Anti-HGenv*TM der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim überprüft. Hierbei wird durch eine leichte Modifizierung des Sandwich ELISA Prinzips der GBV-C-E2 Antikörper in Seren nachgewiesen:

1. Immunreaktion:

Ein biotinylierter monoklonaler Anti-GBV-C-E2 Antikörper aus der Maus wurde mit rekombinant aus CHO-Zellen hergestellten GBV-C-E2 Antigen gemischt (Inkubationslösung 2a) und an eine Streptavidin beschichteten Oberfläche (Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte) gebunden. An das so präsentierte GBV-C-E2 Antigen konnten nun die potentiell vorhandenen Antikörper gegen GBV-C-E2 aus den Patienten-Serumproben binden.

2. Immunreaktion:

Ein in Konjugatpuffer gelöster anti-h-Fcγ~POD aus dem Schaf (Inkubationslösung 4a) konnte nun an die Antikörper gegen GBV-C-E2 aus den Patienten-Serumproben binden.

3. Indikatorreaktion:

Je nach Menge des an den Komplex aus GBV-C-E2 Antikörper gebundenen anti-h-Fcγ~POD kann nach Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung (Lösung 7a) eine bestimmte Fluoreszenz mittels ELISA-Reader ausgelesen werden.

Durchführung des *μPLATE Anti-HGenv*TM ELISA

- vorbereiten aller Lösungen nach Protokoll
- je 10μl der Negativ- und Positivkontrolle und der Serumprobe mit 200μl Probenpuffer verdünnen
- je 20μl für jede der verdünnten Negativ- und Positivkontrolle und Serumproben in die Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben
- je Probe und Standard 80μl Inkubationslösung 2a zugeben
- mit Abdeckfolie abkleben und auf einem Schüttler 2 h inkubieren
- 5 x mit 300μl Waschlösung 9a waschen
- je Probe und Standard 100μl Inkubationslösung 4a zugeben
- mit Abdeckfolie abkleben und auf einem Schüttler 2 h inkubieren
- 5 x mit 300μl Waschlösung 9a waschen

- je Probe und Standard 100µl Substrat-Chromogen-Lösung 7a zugeben
- mit Abdeckfolie abkleben und auf einem Schüttler 1 h im Dunkeln inkubieren
- Auswertung im ELISA-Reader bei 405nm

Funktionskontrolle und Grenzwert Bestimmung

Für die Funktionskontrolle des ELISA wird aus der positiven und negativen Kontrolle der Mittelwert der im ELISA-Reader gemessenen Extinktion (E) ermittelt. Für die Gültigkeit des Tests müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

Der Mittelwert der $E_{\text{negativ Kontrolle}} < 0,25 E$ und der Mittelwert der $E_{\text{positiv Kontrolle}} - E_{\text{negativ Kontrolle}} > 0,5 E$ sein.

Der Grenzwert wird folgendermaßen bestimmt:

$E_{\text{Grenzwert}} = 0,2 \times \text{der Mittelwert von } E_{\text{positiv Kontrolle}} + \text{der Mittelwert von } E_{\text{negativ Kontrolle}}$.

Somit sind die Proben negativ, bei $E_{\text{Probe}} < E_{\text{Grenzwert}}$ und die Proben positiv, bei $E_{\text{Probe}} > E_{\text{Grenzwert}}$.

Bestätigungstest

Bei grenzwertigen Ergebnissen ($E_{\text{Probe}} \pm 15\% E_{\text{Grenzwert}}$) wurde ein Bestätigungstest durchgeführt. Im Unterschied zum normalen Testablauf enthält die Inkubationslösung 2a kein GBV-C-E2 Antigen, sondern es wird nur der Inkubationspuffer eingesetzt.

Auswertung:

Es wird ein Quotient aus den Signalen der Probe mit der normalen Testführung und mit dem Bestätigungstest gebildet:

$E_{\text{Probe normale Testführung}} / E_{\text{Probe Bestätigungstest}} < 1,5$: Die Probe ist GBV-C-E2 Antikörper negativ.

$E_{\text{Probe normale Testführung}} / E_{\text{Probe Bestätigungstest}} > 1,5$: Die Probe ist Anti-GBV-C-E2 Antikörper positiv.

3.5 Sequenzierung des GBV-C-E2 Gens

Um sequenzspezifische Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten und Genotypen der GBV-C-E2 Region herauszuarbeiten, wurde mit Hilfe der in 3.1.1 beschriebenen Methode virale RNS aus Patientenseren mit bekanntem Genotyp isoliert und mit Hilfe einer RT-PCR und nachfolgender „Nested“-PCR amplifiziert. Hierzu wurden die unter 2.3 angegebenen Primer verwendet. Alle „Nested“-PCR Amplifizierungsschritte konnten aufgrund ähnlicher Längen mit denselben PCR-Programmen gefahren werden.

Die Produkte wurden mittels der unter 3.2.4 beschriebenen Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel auf ihre Länge hin überprüft und zum Sequenzieren an die Firma SeqLab, Göttingen geschickt.

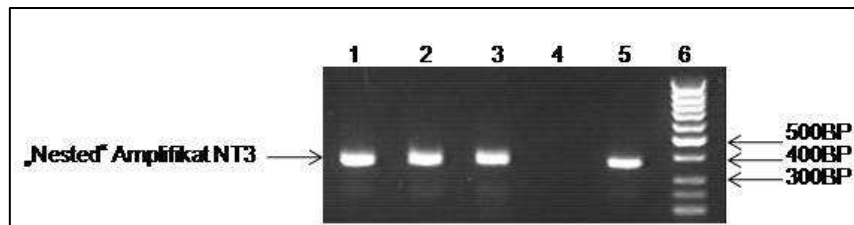


Abbildung 3.3: Agarosegel einer „Nested“ zur Amplifikation des NT3 Produktes. (1-3) NT3 Produkte, (4) Negativ Kontrolle, (5) positiv Kontrolle

Insgesamt wurden sechs Genotyp 1, fünf Genotyp 2, zwei Genotyp 3 und vier Genotyp 5 Isolate, also insgesamt 17 Sequenzen, sequenziert und mit 50 Referenzsequenzen der Onlinedatenbank Genbank verglichen.

Durchführung RT-PCR:

- Ansatz des Reaktions-Mix auf Eis
 - 10µl 5x *QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*TM
 - 2µl dNTPs (10mM)
 - 0,6µl vorwärts Primer (50µM, siehe 2.3)
 - 0,6µl rückwärts Primer (50µM, siehe 2.3)
 - 2µl *QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix*TM
 - 31,3µl RNase freies H₂O
- 46,5µl Reaktions-Mix in ein 200µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettieren
- 3,5µl RNS zupipettieren (zur Negativkontrolle 3,5µl H₂O)
- Reaktionsgefäße verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren

Eine Übersicht über die Lage der Primer im E2-Gen und deren Sequenz können der Abbildung 2.3 entnommen werden.

RT-PCR-Programm für RT-1:

Reverse Transkription:	50°C für 20 min
Initiale Denaturierung:	95°C für 15 min
40 Zyklen:	94°C für 60 s, 55°C für 60 s, 72°C für 60 s
Abkühlen:	4°C bis Entnahme

RT-PCR-Programm für RT-2:

Reverse Transkription:	50°C für 20 min
Initiale Denaturierung:	95°C für 15 min
40 Zyklen:	94°C für 60 s, 55°C für 60 s, 72°C für 60 s
Abkühlen:	4°C bis Entnahme

Die Produkte der RT-PCR werden bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

Durchführung „Nested“- PCR:

- Ansatz des Reaktionsgemisches auf Eis
 - 5µl 10x *Pfu* Puffer mit MgSO₄
 - 1µl dNTPs (10mM)
 - 0,6µl vorwärts Primer (50µM, siehe 2.3)
 - 0,6µl rückwärts Primer (50µM, siehe 2.3)
 - 0,5µl *Pfu* DNS Polymerase
 - 40,8µl Ampuwa H₂O
- 48,5µl Reaktions-Mix in ein 200µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettieren
- 1,5µl RT-PCR Produkt zupipettieren (zur Negativkontrolle 1,5µl H₂O)
- Reaktionsgefäße verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren

PCR-Programm für die zweite Stufe der „Nested“-PCR:

Initiale Denaturierung:	95°C für 2 min
34 Zyklen:	95°C für 60 s, 55°C für 30 s, 72°C für 120 s
Abkühlen:	4°C bis Entnahme

Die „Nested“ Produkte werden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6 Phylogenetische Analyse der 5' UTR und des GBV-C-E2 Gens

Alle phylogenetischen Analysen wurden mit dem Programm ClustalX (Version 2.0.11 (Higgins et al. 1992), das in das Sequenzanalyseprogramm Bioedit integriert ist, durchgeführt. Dieses Programm erlaubt das Erstellen von Alignments und phylogenetischen Bäumen. Hierbei beruht der Algorithmus des Programs ClustalX auf folgendem Verfahren:

Zuerst werden paarweise Alignments für alle Sequenzen berechnet; Übereinstimmungen werden in einer Matrix gespeichert. Diese wird anschließend in eine Distanzmatrix (*distance matrix*) konvertiert, wobei der Distanzwert den evolutionären Abstand zwischen jedem Sequenzpaar widerspiegelt.

Aus dieser Distanzmatrix wird anhand eines Neighbour-Joining-Algorithmus zur Clusterbildung (*Neighbor-joining clustering algorithm*) ein *Guide Tree* oder ein phylogenetischer Baum konstruiert, der die Reihenfolge vorgibt, in der Sequenzpaare angeordnet („aliniert“) und mit vorangegangenen Alignments kombiniert werden sollen. Die Sequenzen werden an jedem Zweigpunkt progressiv angeordnet („aliniert“), wobei mit demjenigen Sequenzpaar begonnen wird, welches den geringsten Abstand aufweist.

Dieser Neighbour-Joining-Algorithmus wurde für alle in dieser Arbeit vorliegenden phylogenetischen Analysen verwendet. Er ist ein mathematisches Verfahren, um Datensätze zu vergleichen und hierarchisch bifurcal (zweigabelig) anzuordnen. Dieses Verfahren wurde 1987 von Saitou und Nei vorgestellt und 1988 von Studier und Keppler weiterentwickelt und vereinfacht. Neighbour-joining basiert auf dem "Minimum Evolution Kriterium" für phylogenetische Bäume:

Ausgehend von einem zunächst sternförmigen "Baum", in dem alle Taxa mit einem "Zentrum" verbunden sind, werden paarweise die DNS- oder Proteinsequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast des Baumes vereinigt. Die genetischen Distanzen der Sequenzen werden neu berechnet und wieder die nächstverwandten zu einem Ast mit zwei Taxa zusammengefügt. Dies erfolgt solange, bis alle Taxa in dem Baum eingefügt wurden und die Sternstruktur des Baumes völlig aufgelöst wurde. Die Ergebnisse wurden mit bis zu 1000 „Bootstrap“ Analysen verifiziert.

Zur Ermittlung der Genotypen wurden die Sequenzen der 5'UTR mit nicht-rekombinanten Referenzsequenzen aus der Online-Datenbank „Genbank“ verglichen. Die einzelnen Referenzsequenzen sind im Anhang IV auf der beigelegten CD-ROM zu finden.

3.7 Bioinformatische Analyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz

Die bioinformatischen Analysen der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz wurden mit der Onlinedatenbank <http://www.predictprotein.org> durchgeführt. Diese Datenbank erkennt die gängigen Proteinmotive, wie Glykosylierungsstellen, Phosphorylierungsstellen, Zinkfinger und Proteinbindungsstellen. Um einen aussagekräftigen Vergleich der phylogenetischen und bioinformatischen Analyse der Sequenzen zu ermöglichen, wurden nur solche Isolate in die Analyse aufgenommen, die eine vollständige GBV-C-E2 Sequenz und den vollständigen GBV-C-5'UTR Abschnitt enthielten. Nach Alignment der 17 von uns sequenzierten GBV-C-E2 mit den verbleibenden 50 GBV-C-E2 Referenzsequenzen aus der Onlinedatenbank „GenBank“ konnte somit eine Analyse der GBV-C-E2 Proteinsequenz hinsichtlich bekannter und mutmaßlicher Proteinmotive durchgeführt werden. Weiterhin wurden die insgesamt 67 GBV-C-E2 Sequenzen auf distinkte, Genotyp-spezifische Unterschiede untersucht.

3.8 Stimulation von RANTES mit rekombinantem GBV-C-E2 und GBV-C-Viruspartikeln unterschiedlicher Genotypen

Es konnte gezeigt werden, dass das Hüllprotein E2 des Hepatitis-C-Virus an CD81 bindet (Pileri et al. 1998) und diese Bindung die Ausschüttung des Zytokins RANTES stimuliert, was wiederum in einer Internalisierung des HIV-Korezeptors CCR5 resultiert (Nattermann et al. 2004). Ebenfalls konnte die Bindung von GBV-C-E2 an CD81 und die Ausschüttung von RANTES nachgewiesen werden (Nattermann et al. 2003). Dem entgegen konnte eine neuere Studie keine Interaktion von GBV-C-E2 und CD81 nachweisen (Kaufman et al. 2007). Durch nachfolgende Experimente sollte überprüft werden, ob durch immobilisierte GBV-C Partikel verschiedener Genotypen bzw. rekombinantes GBV-C-E2 die Ausschüttung von RANTES in gesunden PBMCs stimuliert werden kann. Unterschiede in der Fähigkeit zur RANTES Stimulation der verschiedenen GBV-C-Genotyp Isolate könnten eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse der unterschiedlichen Studien liefern.

3.8.1 Isolierung peripherer Blutlymphozyten durch Ficolldichtegradienten-Zentrifugation

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden nach der von Boyum entwickelten Methode aus EDTA-Vollblut separiert (Boyum 1968). Die Trennung der verschiedenen Bestandteile erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Dichte und Aggregationsfähigkeit. Ficoll ist ein synthetisches, stark verzweigtes Polymer aus Zuckern und Epichlorohydrin. Es bewirkt nach Überschichtung mit verdünntem Vollblut die Aggregatbildung von Erythrozyten und Granulozyten. Durch die anschließende Zentrifugation sedimentieren diese am Boden des Zentrifugenröhrchens. Lymphozyten und Monozyten können aufgrund ihres spezifischen Gewichts nicht in die Ficolltrennlösung eindringen. Sie bilden einen schmalen, milchigen Ring an der Grenzschicht zum Ficoll. Im Überstand sammeln sich Plasma, Thrombozyten und Medium.

Die Separation der Lymphozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen nach folgendem Protokoll:

- 10ml EDTA-Vollblut 1:2 mit RPMI-1640 Zellkulturmedium verdünnen
- 15ml Ficoll (D=1,077) in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen vorlegen
- vorsichtig mit verdünntem Vollblut überschichten.
- zentrifugieren (30 min, 800g, ohne Bremse, bei Raumtemperatur)
- Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pipette abnehmen, in neues Reaktionsgefäß überführen und mit RPMI-Medium auffüllen
- zentrifugieren (10 min, 600g, bei Raumtemperatur)
- Überstand verwerfen
- Sediment in 30ml RPMI-Medium resuspendieren
- zentrifugieren (10 min, 400g, bei Raumtemperatur)
- Waschschrift 2x wiederholen

3.8.2 Untersuchungen zur Stimulation einer RANTES Sekretion bei PBMCs

Die Stimulation einer RANTES Ausschüttung wurde mittels gebundenem rekombinantem GBV-C-E2 Protein bzw. GBV-C-Viruspartikeln an PBMCs gesunder Probanden überprüft. Hierzu wurden GBV-C E2 spezifische polyklonale Antikörper aus dem Serum eines GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten, bzw. ein kommerziell erhältlicher GBV-C-E2 Protein-spezifischer monoklonaler Antikörper aus dem Schaf an eine 96 well Platte gebunden.

Mit diesen Fang-Antikörpern wurden GBV-C-Partikel aus HIV/GBV-C positiven Seren bzw. das rekombinant hergestellte GBV-C-E2 Protein immobilisiert. Mit Hilfe der gebundenen GBV-C-Viruspartikel bzw. dem rekombinanten GBV-C-E2 Protein wurden gesunde isolierte PBMCs über Nacht stimuliert (siehe Abbildung 3.4). Als Vergleich dienten Seren von HIV monoinfizierten und gesunden Probanden. Weitere Kontrollen waren mit Medium versetzte Proben. Die Menge an ausgeschüttetem RANTES-Protein wurde mittels ELISA quantifiziert.

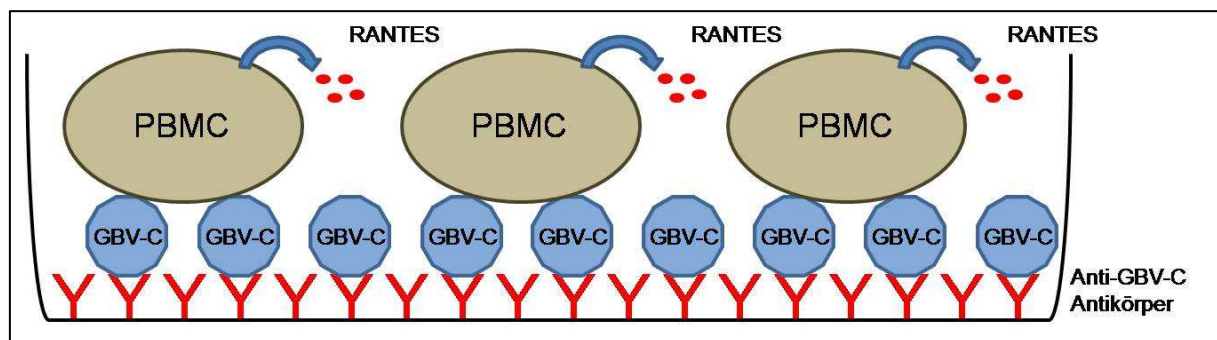


Abbildung 3.4: Mittels immobilisierten GBV-C-E2 Antikörpern wurden aus Seren HIV/GBV-C koinfizierter Patienten GBV-C-Partikel selektiv gebunden. Über diese gebundenen GBV-C Partikel wurden PBMCs gesunder Probanden zur RANTES-Sekretion stimuliert.

Durchführung:

- Je 10µl GBV-C-E2 spezifischer Antikörper (5µg/ml) in 90µl Carbonatpuffer (pH 9,6) in eine 96 well-Platte pipettieren
- Inkubation bei 4°C über Nacht
- 2 x mit 200µl PBS waschen
- pro Vertiefung mit 200µl 1% BSA/Medium Lösung für 30 min bei 37°C blockieren
- 200µl Serum von GBV-C/HIV koinfizierten, HIV monoinfizierten, gesunden Probanden und Medium in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren (siehe Abbildung 3.4)
- 60 min bei 37°C inkubieren
- 2 x mit 200µl PBS waschen

-
- in jede Vertiefung 200.000 Zellen in 200µl Medium pipettieren
 - bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubieren
 - 96er Platte bei 300g 10 min zentrifugieren
 - Überstand abnehmen

3.8.3 RANTES Quantifizierung mittels ELISA

Die RANTES Menge wurde mittels kommerziell erhältlichem RANTES-ELISA der Firma RayBiotech[®] bestimmt.

Durchführung:

- Herstellung der Standardreihe für RANTES: ausgehend von 2000pg/ml
- Je 100µl Standard oder Probe pro Vertiefung zupipettieren
- Inkubation bei Raumtemperatur für 2,5 h
- Absaugen der Vertiefungen und 4 x mit 200µl Waschlösung waschen
- Je 100µl Antikörperkonjugate zugeben
- Inkubation 1 h bei Raumtemperatur
- Absaugen der Vertiefungen und 4 x mit 200µl Waschlösung waschen
- je 100µl Streptavidin zugeben
- Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur
- Absaugen der Vertiefungen und 5 x mit 200µl Waschlösung waschen
- Je 10µl Substratlösung zugeben
- Inkubation 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 50µl Stopplösung zupipettieren
- Auswertung im ELISA-Reader bei 450nm

Die Menge des im Serum enthaltenen RANTES konnte direkt am ELISA-Reader in pg/ml abgelesen werden.

3.8.4 Bindungseffizienz des monoklonalen bzw. polyklonalen Anti-GBV-C-E2 Antikörpers

Der aus dem Serum für den GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten stammende natürliche Antikörper und der monoklonal hergestellte Antikörper wurden auf ihre Effizienz bei der Bindung der GBV-C-Viruspartikel hin verglichen. Hierzu wurden der polyklonale und der monoklonale GBV-C-E2 Antikörper in den Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gebunden. Die Effizienz der Bindung von GBV-C-Viruspartikeln wurde über die Menge an induziertem RANTES gemessen. Zur Stimulation von RANTES wurden hierbei für beide Antikörper die gleichen GBV-C positiven Seren verwendet.

Hierbei stellte sich heraus, dass bei Verwendung der aus einem GBV-C-monoinfizierten Probanden gewonnenen polyklonalen Antikörper die Stimulation der RANTES Sekretion etwa 2,3 Mal so effizient war als bei Benutzung des monoklonalen Antikörpers aus dem Schaf ($p=0,018$) (siehe Abbildung 3.5).

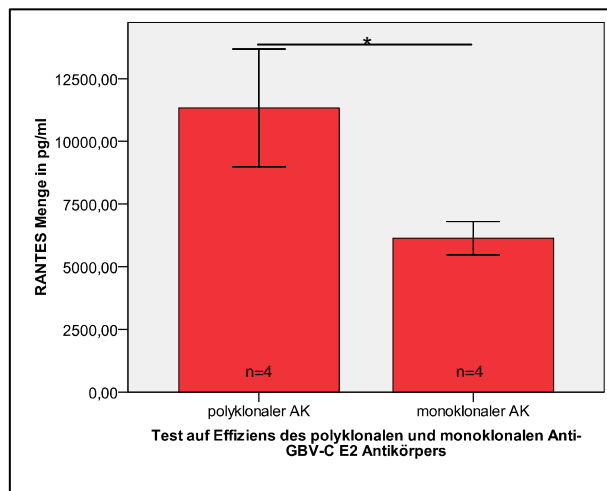


Abbildung 3.5: Sekretion von RANTES nach Stimulation mit gebundenen GBV-C-Viruspartikeln. Bei Verwendung des polyklonalen Antikörpers war die Stimulation der RANTES-Sekretion um etwa den Faktor 2,3 effizienter als bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers.

Um die Spezifität des polyklonalen Antikörpers für GBV-C-Partikel zu überprüfen, wurde dieser in aufsteigender Menge in den Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gebunden (Verdünnung 1:180 (0,03 μ g/ml), 1:60 (0,08 μ g/ml), 1:20 (0,25 μ g/ml), 1:10 (0,5 μ g/ml)) und mit jeweils 3 verschiedenen GBV-C positiven Seren inkubiert und die Effizienz der Bindung von GBV-C-Viruspartikeln wiederum über die Menge an induziertem RANTES gemessen (siehe Abbildung 3.6).

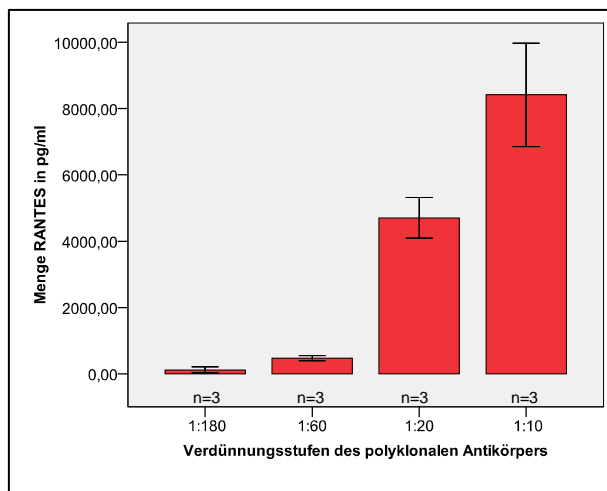


Abbildung 3.6: Sekretion von RANTES nach Stimulation mit gebundenen GBV-C-Viruspartikeln.

Die RANTES-Sekretion war bei der Verdünnungsstufe 1:10 des polyklonalen Antikörpers am Höchsten. Somit wurde für die weiteren Stimulationsexperimente der polyklonale Antikörper in der Verdünnungsstufe 1:10 eingesetzt.

3.9 Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Um die CCR5- und CXCR4-Oberflächenexpression im peripheren Blut von GBV-C/HIV koinfizierten Patienten vergleichen zu können, muss zunächst das Vorhandensein einer CCR5-Δ32 Mutation ausgeschlossen werden, da das Genprodukt bei einer CCR5-Δ32 Mutation nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Deshalb werden alle Patienten und Kontrollen auf eine mögliche heterozygote bzw. homozygote Mutation im CCR5-Gen mit der in unserem Labor entwickelten LightCycler Methode getestet.

3.9.1 CCR5-Genotypisierung mittels SYBR[®] Green

Für die CCR5-Δ32-Genotypisierung wurde ausgenutzt, dass bei Verwendung des Doppelstrang-DNS bindenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR[®]-Green eine Diskriminierung der CCR5-Allele allein über das Schmelzverhalten der um 32 Basenpaare differierenden PCR-Produkte möglich ist. Der Farbstoff SYBR[®]-Green besitzt die Eigenschaft, sich in die kleine Furche von doppelsträngiger DNS einzulagern (Interkalierung). Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt, und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Menge der vorhandenen, doppelsträngigen DNS-Moleküle ist (Ririe et al. 1997).

Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse können dann anschließend die verschiedenen Amplifikate über ihre mittlere Schmelztemperatur unterschieden werden. Als Templates dienten jeweils DNS-Proben eines homozygoten Patienten mit CCR5-Wildtyp bzw. eines Patienten mit homozygoter CCR5- Δ 32 Mutation (Nischalke et al. 2004).

Durchführung:

- Reaktions-Mix pro Ansatz:
- 2 μ l LightCycler FastStart DNS Master^{PLUS} SYBR[®] -Green I Mix
- 1 μ l Primer-Mix (5 μ M)
- 6 μ l H₂O
- 9 μ l Reaktions-Mix in die Kapillaren pipettieren
- 1 μ l DNS zupipettieren (zur Negativkontrolle 1 μ l H₂O)
- Kapillaren verschließen und 5 s bei 700g zentrifugieren
- Kapillaren ins Probenkarussell überführen und PCR zügig starten

PCR-Programm für die CCR5 Genotypisierung:

Initiale Denaturierung:	95°C für 7 min
45 Zyklen:	95°C für 0 s, 60°C für 3 s, 72°C für 5 s
Detektion:	am Ende des Elongations-Schritt bei 72°C (Detektionskanal F1)
Schmelzkurvenanalyse:	5 s / 95°C, 10 s / 70°C anschließend 70°C - 90°C (Heizrata 0,1°C/s) bei kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz

3.9.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS steht für **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen, usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene nachzuweisen.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen.

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie bei einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen (siehe Abbildung 3.7).

Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm. Das von uns verwendete Durchflusszytometer FACSCalibur™ ermöglicht die gleichzeitige Messung folgender optischer Parameter:

1. Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FSC) entlang der Richtung des einfallenden Lichtes, welches ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zelle darstellt.
2. Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC), welches sich im rechten Winkel zum einfallenden Strahl ausbreitet und Aussagen über die intrazelluläre Granularität erlaubt.
3. Fluoreszenz, welche ebenfalls im Seitwärtsstreulicht erfasst wird und durch spezielle Spiegel und Filtersysteme in die verschiedenen Spektralbereiche zerlegt wird (siehe Abbildung 3.7). Dies ermöglicht eine gleichzeitige Analyse von bis zu vier verschiedenen Zielantigenen.

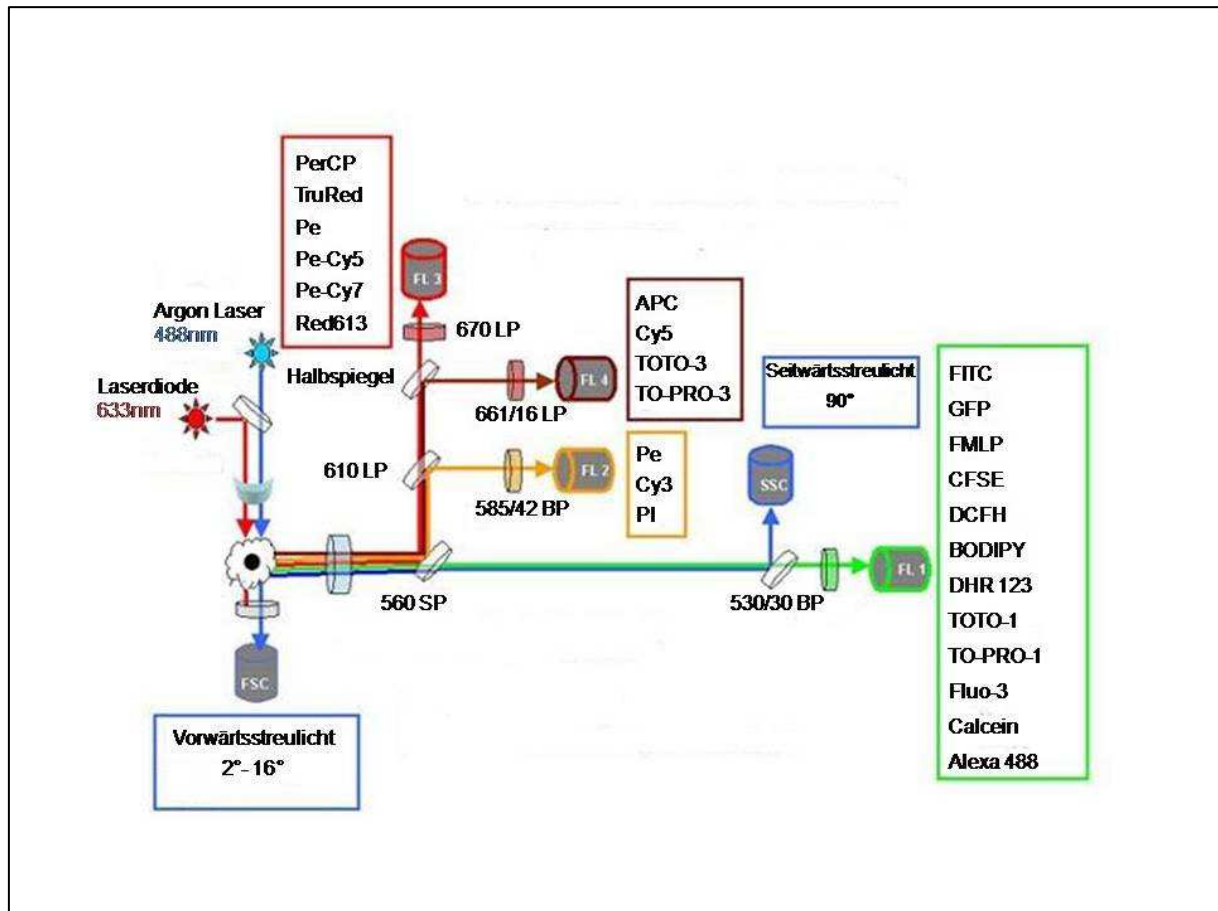


Abbildung 3.7: Schematische Übersicht eines FACSCalibur und gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoffe

Die Abbildung 3.8 zeigt die Bandbreite der Detektionskanäle FL1-FL4 und die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC (*Fluoreszeinisothiocyanat*), PE (*Phycoerythrin*), APC (*Allophycocyanin*) und PerCP (*Peridinin Chlorophyll A Protein*). Die optischen Signale werden mittels Photomultiplier und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt, die dann mit Hilfe der Software *Cell Quest Pro*[®] graphisch dargestellt und ausgewertet werden können.

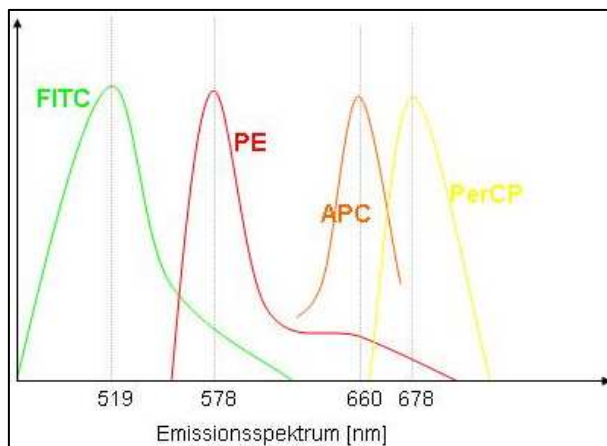


Abbildung 3.8: Emissionsspektrum typischer Fluoreszenzfarbstoffe. Das Emissionsmaximum für FITC liegt bei ca. 519nm, dass für PE bei 578nm, für APC bei 660nm und das Emissionsmaximum für PerCP liegt bei etwa 678nm

Vor jeder Messung müssen die Geräteeinstellungen an die jeweils verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper angepasst werden. Dies geschieht mit Hilfe von sogenannten Isotypkontrollen. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu erkennen, werden Antikörper, die genauso markiert sind wie der Primärantikörper und dem gleichen Isotyp entsprechen, allerdings kein spezifisches Epitop erkennen, bei der FACS-Analyse mit untersucht.

Es werden dabei die Messschwelle, die Fluoreszenzsignalverstärkung und die Kompensationseinstellungen festgelegt. Die Kompensation ist notwendig, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Dabei wird der jeweils in das benachbarte Spektrum reichende Farbanteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert.

3.9.3 Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurde in 150µl Vollblut von HIV mono- und HIV/GBV-C koinfizierten Patienten bestimmt. Hierzu wurden die Oberflächenrezeptoren CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ für die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen und die HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 mittels Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angefärbt. Für die Färbung der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurde ein kommerziell erhältliches Antikörpergemisch, der so genannte TriTEST™ der Firma BD (TriTEST™ CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP) und für den Nachweis der CCR5 und CXCR4 jeweils ein APC konjugierter Antikörper verwendet. Der Antikörper für die Isotypkontrolle stammt aus der Maus und ist ein APC konjugierter IgG1 Antikörper.

Nach Lyse der Erythrozyten und anschließendem Waschschrift konnte so die Oberflächenexpression von

CCR5 und CXCR4 mit einem FACS-Calibur Durchflußzytometer, differenziert nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen, bestimmt werden (siehe Abbildung 3.9).

- Jeweils 150µl Vollblut in drei 5ml Durchflusszytometerröhrchen überführen
- Zu allen drei Röhrchen je 10µl TriTEST™ CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP zupipettieren
- Zu Röhrchen 1: 10µl CCR5-APC zupipettieren
- Zu Röhrchen 2: 10µl CXCR4-APC zupipettieren
- Zu Röhrchen 3: 10µl Isotypkontrolle APC zupipettieren
- 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1ml Lysis Puffer (*BD PharmLyse™*) und 10 min Lyse
- Waschen in 2ml Waschpuffer (*CellWash™*)
- 5 Minuten bei 400g zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
- Pellet in 200µl Fixierungslösung (*CellFix™*) resuspendieren
- Bis zur FACS-Analyse bei 4°C aufbewahren

3.9.3.1 Auswertung der Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 mit Hilfe des Programms Cellquest Pro®

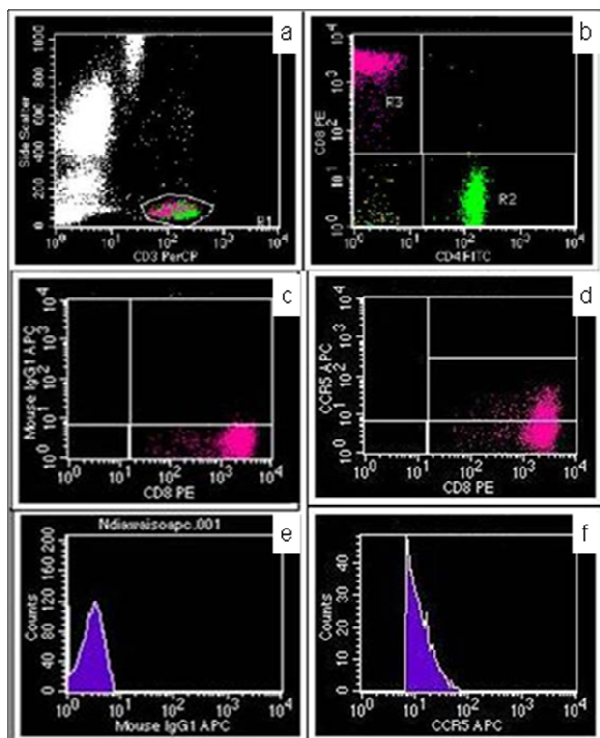


Abbildung 3.9: FACS Analyse Diagramme:

Die oberen beiden Diagramme zeigen einen typischen FACS „Dot-Plot“. Die mit verschiedenen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angefärbten Zellen können mit Hilfe der CellquestPro Software® in verschiedene Bereiche abgebildet werden. (R1 (3.9a), R2, R3 (3.9b)). Die Abbildung der einzelnen Zellen kommt durch die Kombination von Vorwärts- oder Seitwärtsstreulicht (3.9a) und den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zustande (3.9a-3.9d). Mit Hilfe eines Histogramms lässt sich u.a. der geometrische Mittelwert (GeoMean) der Fluoreszenz bestimmen. (3.9e, 3.9f).

Zwei grundlegenden Darstellungen werden am häufigsten genutzt. Das Streudiagramm (Abbildung 3.9a-d) und die Histogrammdarstellung (Abbildung 3.9 e-f). Das Streudiagramm ist eine zweidimensionale Erweiterung des Histogramms.

- 3.9a:** Auf den Achsen des Streudiagramms lassen sich die verschiedenen Detektoren zur Auswahl der gewünschten Zellpopulationen auswählen. Mit Hilfe des PerCP Kanals lassen sich so die CD3⁺ T-Zellen von den übrigen Leukozyten und Zelltrümmern trennen (R1).
- 3.9b:** Durch die Auswahl der Kanäle für FITC auf der X-Achse und PE auf der Y-Achse kann die CD3⁺ T-Zellpopulation auf CD4⁺ T-Zellen (R2) und CD8⁺ T-Zellen (R3) aufgeteilt werden.
- 3.9c:** Mit Hilfe eines IgG1-APC konjugierten Antikörpers wurde die Fluoreszenz der unspezifischen Bindungen gemessen. Durch Setzen der Marke auf 99% der gemessenen Zellen in der Isotypkontrolle und Übernahme dieser Marke in die Streudiagramme von CCR5 und CXCR4 wurde die Fluoreszenz durch unspezifische Bindungen berücksichtigt.
- 3.9d:** Durch eine analoge weitere Marke konnten die CCR5 positiven CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in Form eines Histogramms in den Abbildungen 3.9e und f dargestellt. Die Cellquest Pro Software[®] errechnet aus dieser Verteilung weitere Streuparameter und auch den geometrischen Mittelwert, des spezifischen Fluoreszenzsignals.

3.10 Bestimmung des Serumspiegels von MIP-1 α , MIP-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, IFN- γ und TNF in Seren von HIV⁺ bzw. HIV/GBV-C koinfizierten Patienten

Als natürliche Liganden von CCR5 sind neben RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bekannt. Da vermutet wird, dass CCR5 eine wichtige Rolle bei der Interaktion von HIV und GBV-C einnimmt, sollte die Serumkonzentration von MIP-1 α und MIP-1 β in der HIV-Kohorte aus Bonn und der HIV-Kohorte aus Barcelona untersucht werden.

Zusätzlich war es interessant, typische Zytokine von Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ)- und Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 und TNF)-Lymphozyten zu untersuchen, da in einer Studie von Nunnari et al. bei der Koinfektion mit GBV-C eine stabilisierende Wirkung auf das Th1-Zytokinprofil zugeschrieben wurde, die zu einem besseren Verlauf der HIV-Infektion bei HIV/GBV-C-Koinfizierten beitragen könnte (Nunnari et al. 2003). IP-10 spielt als Chemokin für die Th1-Migration eine wichtige Rolle, scheint aber die Replikation von HIV zu stimulieren (Lane et al. 2003; Foley et al. 2005).

Zur Bestimmung des Zytokinprofils sollten die Zytokine simultan in der gleichen Serumprobe mittels eines CBA (*Cytometric Bead Array*TM, Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt werden. Zusätzlich zu dem Vorteil, mehrere Zytokine in einer Probe simultan messen zu können, benötigt man für die Durchführung dieser Methode nur sehr geringe Mengen an Serum, welches nur in sehr begrenzten Umfang zur Verfügung stand. Da RANTES aus Thrombozyten bei der Präparation von Serum ausgeschüttet wird, wurde RANTES bei diesen Analysen nicht bestimmt. Ebenso existierte bis zum Zeitpunkt der Messung kein Test für SDF-1 mit dem von Becton Dickinson entwickelten *Cytometric Bead Array*.

Insgesamt wurden mit dieser Methode die Konzentration von MIP-1 α , MIP-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, IFN- γ und TNF im Serum von 137 Patienten aus der Bonner HIV-Kohorte simultan gemessen. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft den *dot plot* einer durchflußzytometrischen Messung eines *Cytometric Bead Arrays*.

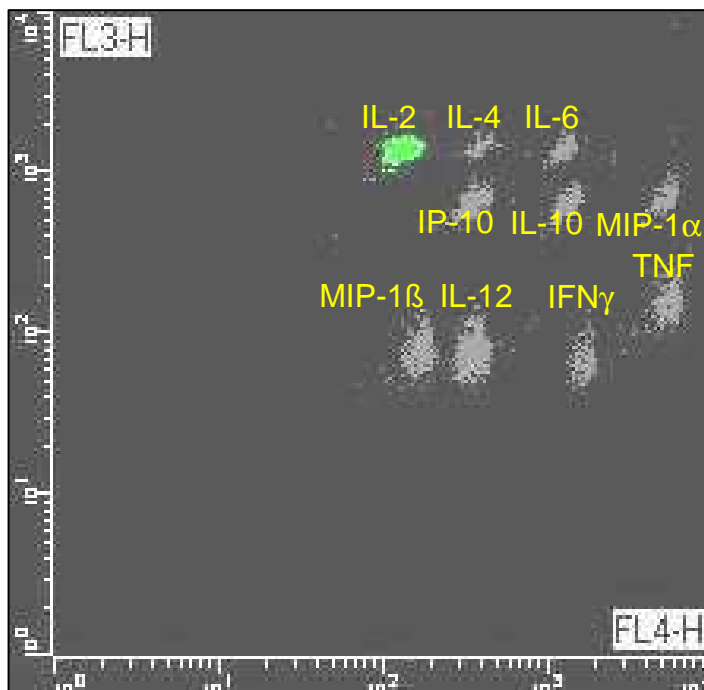


Abbildung 3.10: Position der 10 *bead* (Kügelchen), deren Lage im *dot plot* die Identifizierung der verschiedenen Zytokine erlaubt. Die Stärke der jeweiligen Fluoreszenz ermöglicht es die Konzentration der jeweiligen Zytokine zu messen (eine Population entspricht einem Zytokin; die Oberfläche der Kügelchen trägt Antikörper für das jeweilige Zytokin).

Die Messergebnisse des CBA wurden mittels der FCAP-Array Software ausgewertet. Durch die sehr enge Lage der verschiedenen *bead* Populationen zueinander war eine automatische Auswertung durch die Software jedoch nicht möglich. Vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich war in Folge erheblicher Schwankungen bei wiederholter Messung der gleichen Probe eine zuverlässige Auswertung nicht möglich. Davon betroffen waren die Messungen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, MIP-1 α , IL-12 und IFN- γ . Diese Proben wurden deshalb mit der ELISA-Methode gemessen. Da inzwischen nur noch geringe Mengen an Serum zur Verfügung stand, konzentrierten wir uns auf die Th1 Zytokine IFN- γ und IL-12, die CCR5 Liganden MIP-1 α , und MIP-1 β und das Th1-Chemokin IP-10.

3.10.1 Bestimmung der Chemokine IL12, IP-10, IFN- γ MIP-1 α , und MIP-1 β mittels ELISA

Die Konzentrationen der Chemokine IL12, IP-10 und IFN- γ wurden mit den kommerziell erhältlichen *OptEIA*TM ELISA-Kits der Firma BD gemessen, MIP-1 α und MIP-1 β mit den *Quantikine*TM ELISA-Kits der Firma R&D Systems.

Durchführung der ELISA MIP-1 α , und MIP-1 β :

- Herstellung der Standardreihen im jeweiligen Kalibrierungspuffer (MIP-1 α und MIP-1 β 1000pg/ml – 31,5pg/ml)
- Je 200 μ l Standard oder Probe pro Well zupipettieren
- Inkubation 2 h bei Raumtemperatur
- Absaugen der Vertiefungen und 3 x mit 400 μ l Waschpuffer waschen
- Je 200 μ l Antikörperkonjugate zugeben
- Inkubation 1 h (MIP-1 β , 75 min) bei Raumtemperatur
- 3 x mit 400 μ l Waschpuffer waschen
- Je 200 μ l Substratlösung zugeben
- Inkubation 20 min, im Dunkeln, bei Raumtemperatur
- 50 μ l Stopplösung zupipettieren
- Auswertung im ELISA-Reader bei 450nm

Durchführung der IP-10, IL-12, und IFN- γ ELISA:

- je 100 μ l Fangantikörper für jede Probe, Standard und Zytokin in eine Mikrotiterplatte geben (Verdünnung 1:250 in „Assay Diluent“)
- Inkubation bei 4°C über Nacht
- Absaugen der Fangantikörper und 3 x mit 400 μ l Wasch Puffer pro Vertiefung waschen
- Blockierung der Platten mit 200 μ l pro Vertiefung Assay Diluent
- Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
- Absaugen der Fangantikörper und 3 x mit 400 μ l Wasch Puffer pro Vertiefung waschen
- Herstellung der Standardreihen im jeweiligen Kalibrierungspuffer ausgehend von: IP-10 500pg/ml, IL-12 1000pg/ml, IFN- γ 300pg/ml
- 100 μ l jedes Standards, Probe und Kontrollen in die adäquate Anzahl Vertiefungen pipettieren
- Inkubation 2 h bei Raumtemperatur
- Absaugen der Vertiefungen und 5 x mit 400 μ l Waschlösung waschen
- Je 200 μ l Sekundärantikörper + Streptavidin-HRP (HRP, von engl. *horseradish*) zugeben
- Inkubation 1 h bei Raumtemperatur
- Absaugen der Vertiefungen und 7 x mit 400 μ l Waschlösung waschen
- Je 100 μ l Substratlösung zugeben
- Inkubation 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 50 μ l Stopplösung zupipettieren
- Auswertung im ELISA-Reader bei 450nm

Bei den hier verwendeten ELISA-Kits konnte die Menge der untersuchten Zytokine direkt am ELISA-Reader in pg/ml abgelesen werden.

3.11 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS[®] Version 17.0 durchgeführt. Bei allen statistischen Tests wurden die Stichprobenvariablen mittels des Shapiro-Wilk-Test auf ihre Varianzhomogenität und auf Normalverteilung hin überprüft.

Bei Varianzhomogenität und Normalverteilung der Variablen wurde bei $n > 2$ Subgruppen eine ANOVA und bei $n = 2$ Subgruppen der T-Test angewandt, bei nicht vorhandener Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test für $n > 2$ Subgruppen und der Mann-Whitney-U Test für $n = 2$ Subgruppen durchgeführt. Die Korrelationsanalysen wurden mittels bivariater Produkt-Moment-Korrelation (nach Bravais und Pearson) durchgeführt. Bei nominal verteilten Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Als signifikant galten p-Werte $\leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Analyse der HIV-Kohorten aus Bonn und Barcelona

Im folgenden Abschnitt der Dissertation wird der Einfluss einer GBV-C-Koinfektion auf wichtige klinische Parameter wie die HIV-Viruslast und den Immunstatus beschrieben und zu der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen und der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellratio in Bezug gesetzt.

Da ein wesentlicher Zweck der Untersuchungen darin bestand, Unterschiede zwischen den verschiedenen GBV-C-Genotypen zu finden, musste eine große Anzahl von Patienten rekrutiert werden, da neben dem im europäischen Raum hauptsächlich vorherrschenden GBV-C Genotyp 2 andere GBV-C-Genotypen nur selten vorkommen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Daten von 2 europäischen HIV-Kohorten zusammengefasst.

4.1.1 Rekrutierung der multizentrischen HIV-Kohorte Bonn und Barcelona

In dem Zeitraum März 2005 bis Oktober 2007 sind 406 Patienten der Immunologischen Ambulanz der Medizinischen Universitätsklinik I der Universität Bonn und von Oktober 2005 bis Februar 2006 199 Patienten aus der HIV-Ambulanz des Krankenhauses Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona (Spanien) in die Untersuchungen einbezogen worden.

Von den 406 Patienten der Kohorte aus Bonn und den 199 Patienten der Kohorte aus Barcelona wurden Serum und EDTA-Blutproben gesammelt, aliquotiert und bei -80°C asserviert. Dazu konnten vollständige klinische Daten von 381 der 406 Patienten der Kohorte aus Bonn und von 193 der 199 Patienten der Kohorte Barcelona erfasst werden. Damit stehen insgesamt 574 Patienten zur Auswertung zur Verfügung.

4.1.2 Zusammensetzung der HIV-Kohorten aus Bonn und Barcelona

Eine Übersicht über die Zusammensetzung jeweils der Kohorten aus Bonn und Barcelona und der gesamten Studienpopulation Bonn/Barcelona zeigt die Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1: Vergleich der klinischen Daten der Kohorten aus Bonn und Barcelona

		Kohorten						p ^{**}
		Bonn		Barcelona		gesamte Studienpopulation		
		Anzahl	%*	Anzahl	%*	Anzahl	%*	
Geschlecht	männlich	288	75,6%	149	77,2%	437	76,1%	n.s.
	weiblich	93	24,4%	44	22,8%	137	23,9%	
Ethnie	Afrikaner	54	14,2%	3	1,5%	57	9,9%	p<0,001
	Asiate	9	2,4%	4	2,1%	13	2,3%	
	Kaukasier	311	81,6%	180	93,3%	491	85,5%	
	Lateinamerikaner	7	1,8%	6	3,1%	13	2,3%	
HIV-Transmission	MSM^{***}	197	51,7%	68	35,2%	265	46,2%	p=0,001
	Heterosexuell^{***}	115	30,3%	55	28,4%	170	29,6%	p=0,003
	Blut/Blutprodukte	20	5,2%	3	1,5%	23	4,0%	
	ivdu^{***}	34	8,9%	60	30,9%	94	16,4%	p<0,001
	unbekannt	15	3,9%	7	3,6%	22	3,8%	
CDC Stadien (ABC)	CDC Stadium A	186	48,8%	129	66,8%	315	54,9%	p<0,001
	CDC Stadium B	97	25,5%	15	7,7%	112	19,5%	p<0,001
	CDC Stadium C	98	25,7%	49	25,3%	147	25,7%	
Opp. Infektionen	keine opp. Inf.	286	75,1%	158	81,9%	444	77,4%	n.s.
	opp. Inf.	95	24,9%	35	18%	130	22,7%	

* Prozent innerhalb der Kohorte

** statistische Signifikanz des Chi-Quadrat Test für den Vergleich der Kohorten aus Bonn und Barcelona

*** HIV Risikofaktoren: MSM (**m**en who have sex with **m**en), heterosexuelle Kontakte, ivdu (**I**ntravenous **D**rug **U**se)

Tabelle 4.1: Vergleich der klinischen Daten der Kohorten aus Bonn und Barcelona (Fortsetzung)

		Kohorten						p**
		Bonn		Barcelona		gesamte Studienpopulation		
		Anzahl	%*	Anzahl	%	Anzahl	%	
HAART Status	ohne HAART	105	27,6%	15	7,7%	120	20,9%	p<0,001
	mit HAART	276	72,4%	178	92,2%	454	79,1%	
HCV Infektionsstatus	HCV negativ	317	83,2%	125	64,4%	442	77,1%	p<0,001
	HCV positiv	64	16,8%	68	35,2%	132	23,0%	
HIV-Viruslast	HIV RNS <50 Kop./ml	222	58,3%	134	69,4%	356	62,0%	p=0,008
	HIV RNS >50 Kop./ml	159	41,7%	59	30,4%	218	38,0%	
Immunstatus CD4⁺ T- Zellen	<200 (abs./µl)	59	15,5%	21	10,8%	80	14,0%	n.s.
	>200 (abs./µl)	322	84,5%	172	89,1%	494	86,1%	
								p****
HIV-Viruslast (Kop./ml)***		15.862		30.110		20.295		n.s.
95% Konfidenzintervall*****		(1.840-35.371)		(0-18.974)		(11.300-29.292)		
CD4⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		453		483		461		n.s.
95% Konfidenzintervall		(352-531)		(403-645)		(440-482)		
CD4⁺/CD8⁺ Ratio		0,56		0,55		0,55		n.s.
95% Konfidenzintervall		(0,49-0,73)		(0,41-0,60)		(0,52-0,58)		
CD8⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		940		1048		976		n.s.
95% Konfidenzintervall		(893-987)		(964-1.132)		(934-1.019)		
HCV-Viruslast (Kop./ml)		5.900.077		374.881		4.087.122		p=0,007
95% Konfidenzintervall		(3.511.887-8.288.268)		(230.801-518.962)		(2.374.370-5.799.875)		

* Prozent innerhalb der Kohorte

** statistische Signifikanz des Chi-Quadrat Test für den Vergleich der Kohorten aus Bonn und Barcelona

*** Mittelwerte

**** statistische Signifikant des T-Tests für 2 unabhängige Stichproben für den Vergleich der Kohorte aus Bonn und Barcelona

***** 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes

Wie aus der Tabelle 4.1 ersichtlich überwiegt in den HIV-Kohorten aus Bonn und Barcelona das männliche Geschlecht mit 76,1% gegenüber dem weiblichen Geschlecht mit 23,9%. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in den HIV-Risikofaktoren wider: In beiden Kohorten wird die HIV-Infektion hauptsächlich über homosexuelle Kontakte (MSM 46,2%) übertragen, wobei die Bonner Kohorte mit 197 Patienten (51,7%) einen signifikant höheren Anteil homosexueller Patienten als die Kohorte aus Barcelona mit 68 Patienten (35,2%) aufweist ($p=0,001$). Ebenfalls überwiegt die Übertragung von HIV durch die Gabe von kontaminierten Blut bzw. Blutprodukten in der Kohorte aus Bonn (5,2%) im Vergleich zu der Kohorte aus Barcelona (1,5%; $p=0,003$), während die Übertragung durch intravenösen Drogenabusus (ivdu) in der Kohorte aus Barcelona mit 30,9% gegenüber 8,9% in der Bonner Kohorte ($p<0,001$) überwiegt.

Bezüglich der Ethnien gibt es zwischen den beiden Kohorten einen signifikanten Unterschied im Anteil der afrikanischen Patienten. Die Anzahl afrikanischer Patienten ist in der Kohorte aus Bonn mit 54 (14,2%) Patienten signifikant höher als in der Kohorte aus Barcelona ($n=3$, 1,5%; $p<0,001$). Während in der HIV-Kohorte aus Barcelona nur 9,8% ihr Herkunftsland außerhalb von Spanien haben, liegt der Anteil an ausländischen Patienten in Bonn bei 26,2%. In der Kohorte aus Bonn sind von 381 bezüglich einer HCV-Infektion untersuchten Patienten 64 mit HCV koinfiziert (16,8%). Im Gegensatz hierzu sind in der Kohorte Barcelona von den 193 auf HCV getesteten Patienten 68 HCV positiv (35,2%; $p<0,001$).

Bei den Patienten aus Barcelona ist die HCV-Viruslast signifikant niedriger als bei den Patienten aus Bonn ($p=0,007$, siehe Tabelle 4.1).

In beiden Kohorten befindet sich der Großteil der Patienten im CDC Stadium A (Bonn: $n=186$ (48,8%); Barcelona: $n=129$ (66,8%)), wobei in der Kohorte aus Barcelona sich insgesamt signifikant mehr Patienten im CDC Stadium A ($p<0,001$) und B ($p<0,001$) befinden, als in der Kohorte aus Bonn.

In der Kohorte Bonn erhielten 276 von 381 (72,4%) Patienten eine HAART. In der Kohorte Barcelona waren es 178 von 193 (92,3%) Patienten ($p<0,001$).

Die Kohorte aus Barcelona enthält signifikant mehr Patienten mit einer kontrollierten HIV-Infektion (HIV-RNS <50 Kop./ml) im Vergleich zur Kohorte aus Bonn ($p=0,008$; Bonn: 58,3%; Barcelona: 69,4%).

In der Kohorte aus Bonn haben 95 von 381 Patienten eine opportunistische Infektion (24,9%) und in der Kohorte aus Barcelona 35 von 193 Patienten (18,1%). Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Zwischen den Kohorten aus Barcelona und Bonn bestehen dagegen keine Unterschiede bezüglich der HIV-Viruslast, des Immunstatus gemessen an der Anzahl der HIV infizierten Patienten mit einer CD4⁺ T-Zellzahl über bzw. unter 200 Zellen/ μ l, der absoluten CD4⁺/CD8⁺ T-Zellzahlen und der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellratio.

4.1.3 Koinfektion mit GBV-C

Der GBV-C-Infektionsstatus wurde mit Hilfe der unter 3.2.5 beschriebenen „nested“ PCR untersucht. Ebenfalls überprüft wurde das Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern mittels ELISA (siehe 3.4).

Vollständige virologische Daten konnten von 376 der 381 Patienten der HIV-Kohorte aus Bonn und von 188 der 193 Patienten der HIV-Kohorte aus Barcelona akquiriert werden. Eine Übersicht über den GBV-C Infektionsstatus und das Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern für die Kohorten aus Bonn und Barcelona zeigt die Tabelle 4.2:

Tabelle 4.2.: Übersicht über die Infektion mit GBV-C und das Vorhandensein von GBV-C-E2 Antikörpern in der Studienpopulation

	HIV ⁺ /GBV-C [*]		HIV ⁺ /GBV-C RNS ⁺		HIV ⁺ / GBV-C-E2 Ak. ⁺		HIV ⁺ /GBV-C ⁺ & GBV-C E2 Ak. ^{+**}	
	Anzahl	% ^{***}	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
	Kohorten							
Bonn	172	45,7%	91	24,2%	103	27,4%	10	2,7%
Barcelona	94	50,0%	39	20,7%	54	28,7%	1	0,5%
gesamte Studienpopulation	266	47,2%	130	23%	157	27,8%	11	2,0%

* für GBV-C-RNS und den GBV-C-E2 Antikörper negativ

** positiv für GBV-C-RNS und den GBV-C-E2 Antikörper

*** Prozente der Gruppen

Insgesamt wurde eine replikative Koinfektion mit GBV-C bei 130 der 564 in die Analyse eingeschlossenen Fälle gefunden (23%). GBV-C-E2 Antikörper, als Hinweis auf eine zurückliegende GBV-C-Infektion, konnten bei 157 der 564 Patienten nachgewiesen werden (27,8%). GBV-C-E2 Antikörper waren zusammen mit einer replikativen GBV-C-Infektion bei 11 (2%) der Patienten vorhanden.

Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung der GBV-C-RNS positiven und GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten zwischen den Kohorten aus Bonn und Barcelona. Dies erlaubt, unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 4.1.2, die Datensätze beider Kohorten gemeinsam zu analysieren. Die Tabelle 4.3 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der klinischen Daten, Tabelle 4.4 der immunologischen Daten in Bezug auf GBV-C-Virämie bzw. GBV-C-E2 Antikörpern in der gesamten Studienpopulation.

Tabelle 4.3: Einfluss einer Koinfektion mit GBV-C bzw. Vorhandensein von GBV-C- E2 Antikörpern auf die Verteilung klinische Parameter in der gesamten Studienpopulation

		Gesamte Studienpopulation								p**
		HIV ⁺ /GBV-C ⁻		HIV ⁺ /GBV-C RNS ⁺		HIV ⁺ /GBV-C-E2 Ak. ⁺		HIV ⁺ /GBV-C ⁺ & GBV-C-E2 Ak. ⁺		
		Anzahl	%*	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	
Geschlecht	männlich	193	72,6%	110 ^a	84,6%	118	75,2%	7	63,6%	p=0,033
	weiblich	73	27,4%	20	15,4%	39	24,8%	4	36,4%	
Ethnie	Afrikaner	31	11,7%	12	9,2%	10	6,4%	4	36,4%	n.s.
	Asiate	7	2,6%	2	1,5%	3	1,9%	0	0,0%	
	Kaukasier	225	84,6%	112	86,2%	139	88,5%	7	63,6%	
	Latein-amerikaner	3	1,1%	4	3,1%	5	3,2%	0	0,0%	
HIV-Transmission	MSM	107	40,2%	75 ^b	57,7%	75	47,8%	5	45,5%	p=0,011
	Heterosexuell	91	34,2%	29	22,3%	39	24,8%	6	54,5%	
	Blut/Blutkons.	15	5,6%	3	2,3%	4	2,5%	0	0,0%	
	ivdu	41	15,4%	18	13,8%	34	21,7%	0	0,0%	
	unbekannt	12	4,5%	5	3,8%	5	3,2%	0	0,0%	
CDC Stadien (ABC)	CDC Stadium A	152	57,1%	67	51,5%	85	54,1%	8	72,7%	n.s.
	CDC Stadium B	49	18,4%	24	18,5%	36	22,9%	2	18,2%	
	CDC Stadium C	65	24,4%	39	30,0%	36	22,9%	1	9,1%	
Opp. Infektionen	keine opp. Infektion	207	77,8%	96	73,8%	125	79,6%	10	90,9%	n.s.
	opp. Infektion	59	22,2%	34	26,2%	32	20,4%	1	9,1%	

* Prozente der Gruppen

** statistische Signifikanz des Chi-Quadrat Test über die Gruppen HIV⁺/GBV-C⁻, HIV⁺/GBV-C⁺, HIV⁺/GBV-C-E2 Ak⁺ und HIV⁺/GBV-C⁺ & GBV-C-E2 Ak.⁺

a: HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁻: p=0,008

HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C-E2 Antikörper⁺: p=0,048

HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C-RNS & GBV-C-E2 Ak⁺: p=0,075

b: HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁻: p=0,001

HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C-E2 Antikörper⁺: p=0,098

HIV⁺/GBV-C RNS⁺ vs. HIV⁺/GBV-C RNS & GBV-C-E2 Ak⁺: p=0,531

Tabelle 4.4: Einfluss einer Koinfektion mit GBV-C bzw. Vorhandensein von GBV-C-E2 Antikörpern auf die virologischen und immunologischen Parameter in der gesamten Studienpopulation

		Gesamte Studienpopulation							
		HIV ⁺ /GBV-C ⁻		HIV ⁺ /GBV-C RNS ⁺		HIV ⁺ /GBV-C-E2 Ak. ⁺		HIV ⁺ /GBV-C ⁻ & GBV-C-E2 Ak. ⁺	
		Anzahl	% [*]	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
HAART Status	ohne HAART	54	20,3%	26	20,0%	36	22,9%	3	27,3%
	mit HAART	212	79,7%	104	80,0%	121	77,1%	8	72,7%
HCV-Infektion	HCV negativ	207	77,8%	106	81,5%	111	70,7%	11	100,0%
	HCV positiv	59	22,2%	24	18,5%	46	29,3%	0	0,0%
HIV-Viruslast	HIV-RNS <50 (Kop./ml)	171	64,3%	79	60,8%	94	59,9%	4	36,4%
	HIV-RNS >50 (Kop./ml)	95	35,7%	51	39,2%	63	40,1%	7	63,6%
Immunstatus CD4⁺ T-Zellen	<200 (abs./ml)	38	14,3%	19	14,6%	21	13,4%	0	0,0%
	>200 (abs./ml)	228	85,7%	111	85,4%	136	86,6%	11	100%
HIV-RNS (Kop./ml)**		12.604		16.706		38.647		2.985	
95% Konfidenzintervall***		(6.650-18.557)		(5.784-27.628)		(8.600-68.692)		(0-6.650)	
CD4⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		475		406		484		553	
95% Konfidenzintervall		(444-505)		(370-440)		(440-527)		(326-779)	
CD4⁺/CD8⁺ T-Zell Ratio		0,56		0,50		0,56		0,96	
95% Konfidenzintervall		(0,52-0,60)		(0,45-0,56)		(0,51-0,61)		(0,49-1,43)	
CD8⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		980		942		1.020		788	
95% Konfidenzintervall		(920-1.040)		(868-1.014)		(923-1.116)		(374-1.202)	
HCV-RNS (Kop./ml)		1.995.924		10.013.200		4.142.482		-	
95% Konfidenzintervall		(745.073-3.246.775)		(812.921-19.213.478)		(1.925.407-6.359.557)			

* Prozente der Gruppen

** Mittelwerte

*** 95% Konfidenzintervalle des Mittelwertes über die Subgruppen

In der Gruppe der HIV/GBV-C koinfizierten Patienten war der Anteil der Patienten, die sich durch MSM mit dem HI-Virus infiziert hatten gegenüber der Gruppe der HIV monoinfizierten Patienten überrepräsentiert ($p=0,001$, siehe Tabelle 4.3). Analog hierzu ist das männliche Geschlecht in der Gruppe der GBV-C positiven Patienten signifikant häufiger vertreten als in der HIV monoinfizierten Gruppe ($p=0,008$, siehe Tabelle 4.3).

Wenn auch durch die kleine Anzahl von 11 Patienten nicht statistisch signifikant, so hebt sich die Gruppe der gleichzeitig für GBV-C-RNS und GBV-C-E2 Antikörper positiv getesteten HIV-Patienten positiv von den anderen Gruppen ab:

In ihr

- sind mit 72,7% die prozentual meisten Patienten im CDC Stadium A,
- haben mit 9,1% prozentual am wenigsten Patienten eine opportunistische Infektion,
- liegt die $CD4^+/CD8^+$ T-Zellratio mit 0,96 nur wenig vom Normalwert von 1,3 entfernt
- haben 100% der Patienten eine $CD4^+$ T-Zellzahl von über 200 Zellen/ μ l
- liegen mit 2.985 Kopien/ml die HIV-Viruslast am niedrigsten.

Zusätzlich zeichnet sich diese Gruppe durch das Fehlen von HCV koinfizierten Patienten aus. Bei 114 Patienten der 130 GBV-C positiven Patienten aus der gesamten Studienpopulation konnte die GBV-C-Viruslast mit Hilfe der LC-Methode aus 3.3.3 quantitativ bestimmt werden (durchschnittliche Viruslast: 875.485 Kopien/ml). Dabei ergaben sich die in Tabelle 4.5 dargestellten Korrelationen zwischen der GBV-C- und der HIV-Viruslast bzw. der $CD4^+$ T-Zellzahl.

Tabelle 4.5: Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl

			HIV- Viruslast	CD4 ⁺ T-Zellzahl
gesamte Studienpopulation	GBV-C- Viruslast	Korrelationskoeffizient*	-0,269	0,265
		Signifikanz**	0,004	0,004
		Anzahl	114	114
Kohorte aus Bonn	GBV-C- Viruslast	Korrelationskoeffizient	-0,319	0,251
		Signifikanz	0,004	0,027
		Anzahl	79	79
Kohorte aus Barcelona	GBV-C- Viruslast	Korrelationskoeffizient	0,149	0,380
		Signifikanz	0,39	0,025
		Anzahl	35	35

* Korrelationskoeffizient R nach Pearson

** Signifikanz der Korrelation nach Pearson

Am Auffälligsten dabei ist ein signifikant inverser Zusammenhang zwischen der GBV-C-Viruslast ($p=0,004$) und der HIV-Viruslast. Dieser Zusammenhang findet sich bei isolierter Betrachtung auch in der Kohorte aus Bonn wieder ($p=0,004$), nicht aber in der Kohorte aus Barcelona, in der jedoch ein gleichsinniger Trend erkennbar ist ($p=0,39$, siehe Abbildung 4.1). Dieser Korrelation entspricht auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der GBV-C-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl/ μl ($p=0,004$).

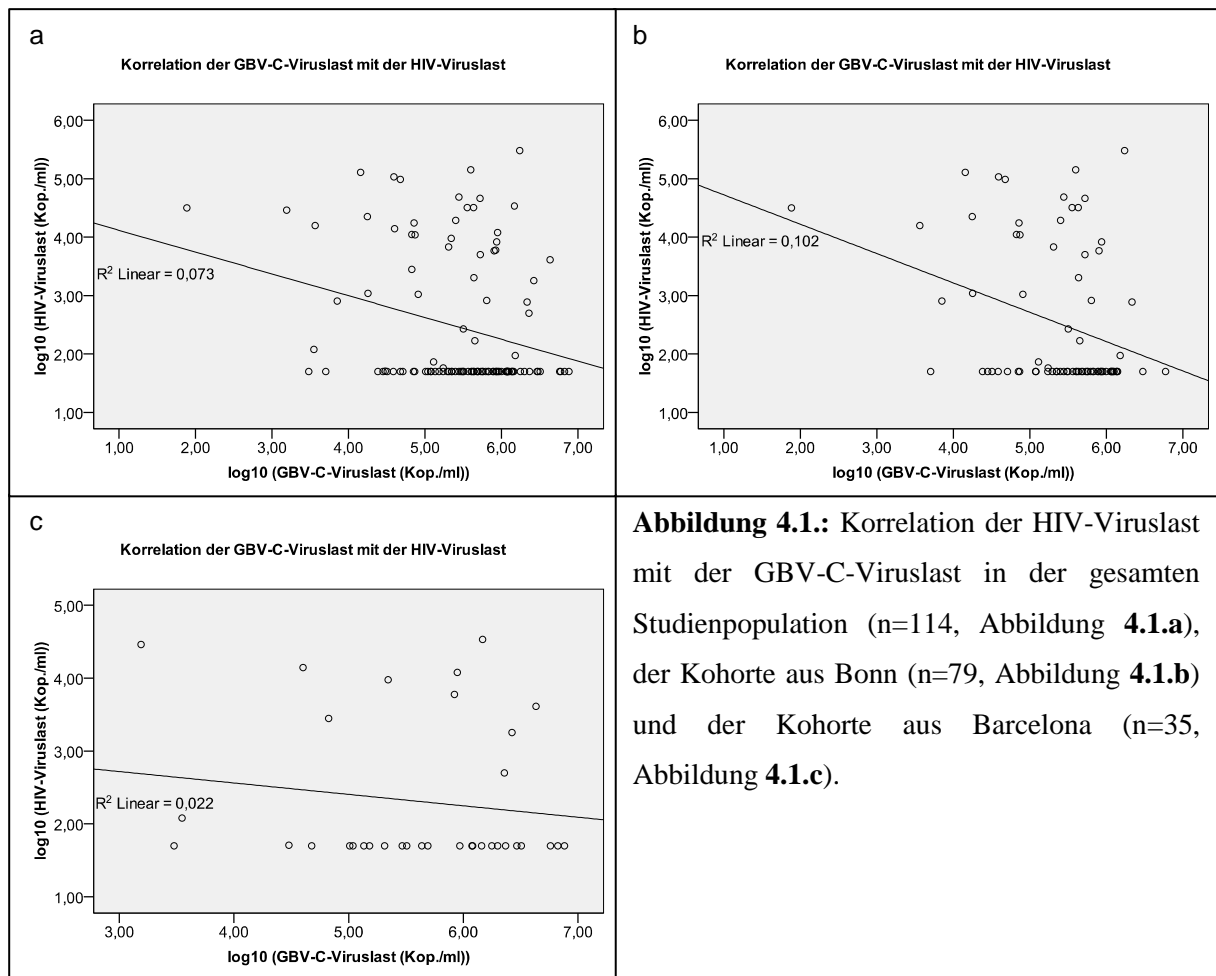


Abbildung 4.1.: Korrelation der HIV-Viruslast mit der GBV-C-Viruslast in der gesamten Studienpopulation (n=114, Abbildung 4.1.a), der Kohorte aus Bonn (n=79, Abbildung 4.1.b) und der Kohorte aus Barcelona (n=35, Abbildung 4.1.c).

Diese Korrelation konnte bei isolierter Betrachtung sowohl in der Kohorte aus Bonn ($p=0,027$) und in der Kohorte aus Barcelona beobachtet werden ($p=0,025$, siehe Abbildung 4.2).

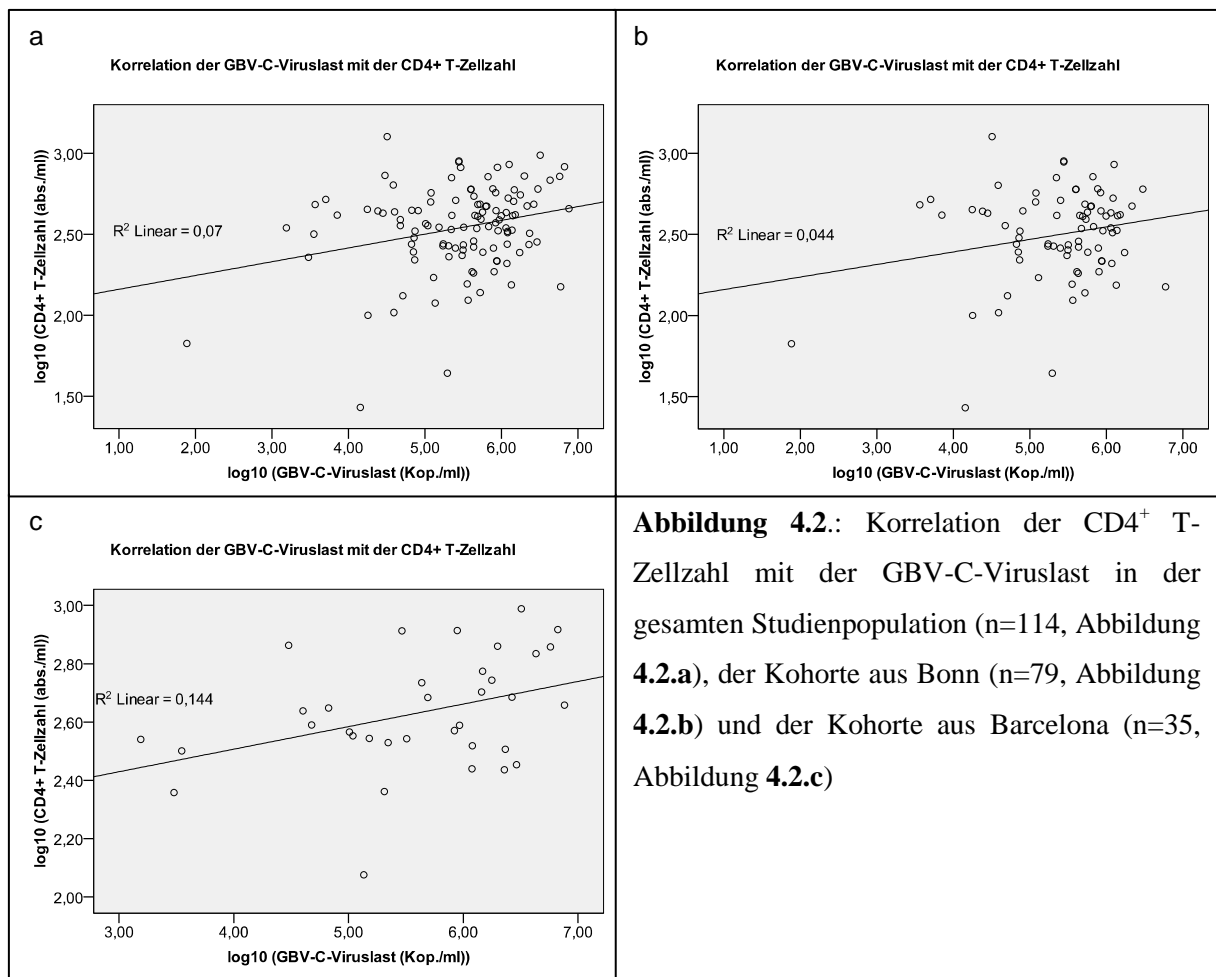


Abbildung 4.2.: Korrelation der CD4⁺ T-Zellzahl mit der GBV-C-Viruslast in der gesamten Studienpopulation (n=114, Abbildung 4.2.a), der Kohorte aus Bonn (n=79, Abbildung 4.2.b) und der Kohorte aus Barcelona (n=35, Abbildung 4.2.c)

4.1.4 Der Einfluss der HAART-Therapie auf die HIV-Viruslast und die CD4⁺ T-Zellzahl

Im nächsten Abschnitt der Dissertation wird beschrieben, welchen Einfluss eine HAART auf die beobachteten Effekte der GBV-C-Koinfektion bezüglich der HIV-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl hat. In der gesamten Studienpopulation erhielten 445 (78,9%) der 564 Patienten eine HAART. Patienten mit einer GBV-C-Koinfektion bzw. nachweisbaren GBV-C-E2 Antikörpern verteilten sich wie folgt in den Gruppen mit und ohne HAART:

Tabelle 4.6: Übersicht über die Verteilung einer Koinfektion mit GBV-C bzw. Nachweis von GBV-C-E2 Antikörpern zwischen Patienten mit und ohne HAART

	gesamte Studienpopulation			
	ohne HAART		mit HAART	
	Anzahl	%	Anzahl	%
HIV ⁺ /GBV-C-RNS ⁻	54	45,4%	212	47,6%
HIV ⁺ /GBV-C-RNS ⁺	26	21,8%	104	23,4%
HIV ⁺ /GBV-C-E2 Ak. ⁺	36	30,3%	121	27,2%
HIV ⁺ /GBV-C-RNS ⁺ & GBV-C-E2 Ak. ⁺	3	2,5%	8	1,8%
Gesamt	119	100,0%	445	100,0%

Patienten mit einer GBV-C-Koinfektion bzw. nachweisbaren GBV-C-E2 Antikörpern waren in der Gruppe mit HAART und der Gruppe ohne HAART gleichverteilt (siehe Tabelle 4.6).

Es bestätigte sich, auch bei Berücksichtigung von HAART, die inverse Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast und die direkte Korrelation mit der CD4⁺ T-Zellzahl (siehe Tabelle 4.7 und Abbildung 4.3):

Tabelle 4.7: Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl aufgeschlüsselt nach HAART

	ohne HAART		mit HAART	
	HIV-Viruslast	CD4 ⁺ T-Zellzahl	HIV-Viruslast	CD4 ⁺ T-Zellzahl
GBV-C Viruslast				
Korrelationskoeffizient*	-0,478	0,429	-0,231	0,215
Signifikanz**	0,039	0,046	0,029	0,040
Anzahl	22	22	92	92

* Korrelationskoeffizient R nach Pearson

** Signifikanz der Korrelation nach Pearson

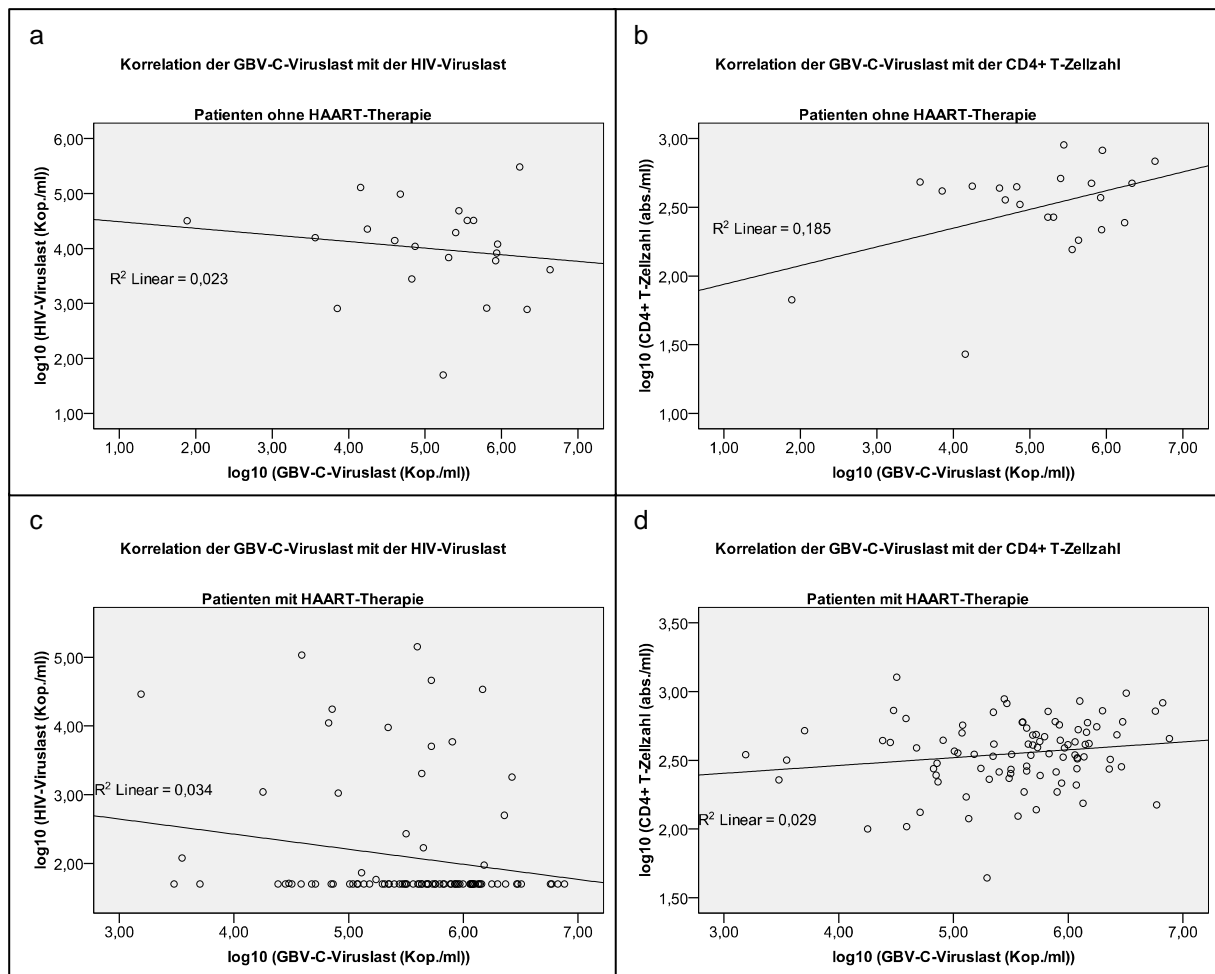


Abbildung 4.3: Die Abbildungen 4.3a-d zeigen die Korrelationen zwischen der GBV-C Viruslast und der HIV-Viruslast bzw. der CD4⁺ T-Zellzahl in der gesamten Studienpopulation für Patienten ohne HAART-Therapie (Abbildung 4.3.a, b) und Patienten, die zur Zeit der Untersuchung eine HAART erhielten (Abbildung 4.3.c, d).

4.1.5 Der Einfluss des GBV-C-Genotyps

Bei 127 der 130 in die Analyse eingeschlossenen GBV-C-RNS positiven Patienten der gesamten Studienpopulation konnte der GBV-C-Genotyp mittels Sequenzierung eines 256-bp DNA Fragmentes der 5'GBV-C-UTR und anschließender phylogenetischer Analyse mit den Programmen Bioedit und ClustalX bestimmt werden (siehe 3.6). Die Verteilung der Genotypen in der Gesamtkohorte, sowie den beiden Teilkohorten aus Bonn und Barcelona, zeigt Tabelle 4.8. Ein Ausschnitt des zu dieser Genotyp Verteilung gehörenden phylogenetischen Baums ist in Abbildung 4.4 dargestellt, der gesamte phylogenetische Baum ist in Anhang III zu finden.

Tabelle 4.8: Verteilung der GBV-C-Genotypen in den Kohorten aus Bonn und Barcelona und der gesamten Studienpopulation

	Kohorten					
	Bonn		Barcelona		gesamte Studienpopulation	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
GBV-C Genotyp 1	8	9,1%	6	15,4%	14	11,0%
GBV-C- Genotyp 2	72	81,8%	33	84,6%	105	82,7%
GBV-C Genotyp 3	2	2,3%	0	0,0%	2	1,6%
GBV-C Genotyp 5	6	6,8%	0	0,0%	6	4,7%
Gesamt	88	100,0%	39	100,0%	127	100,0%

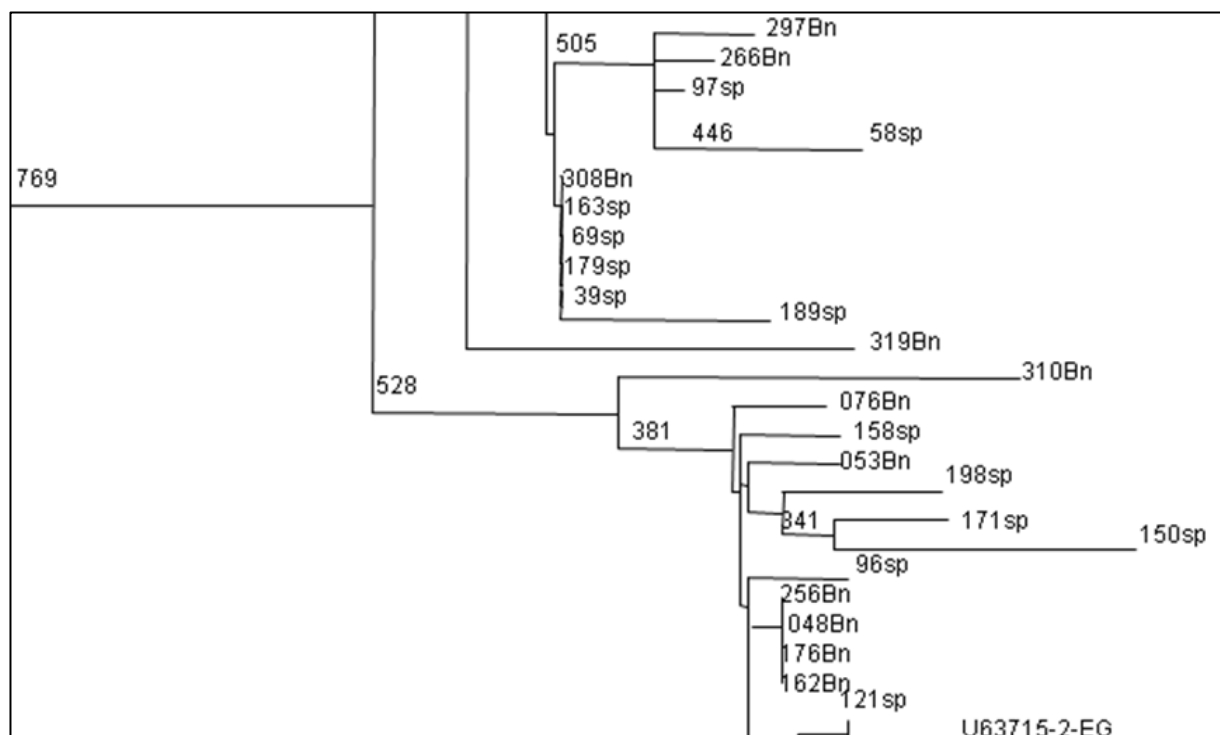


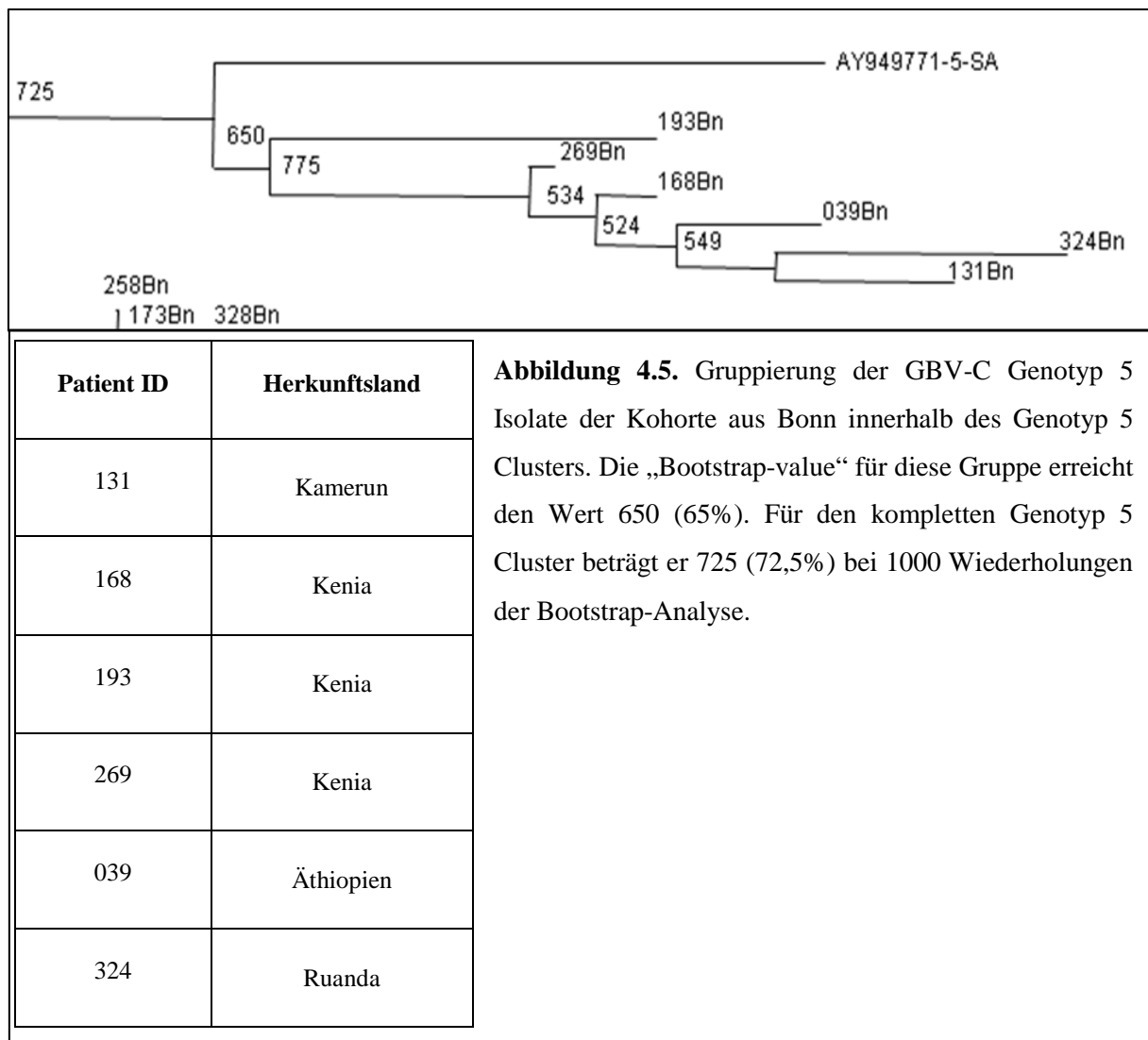
Abbildung 4.4: Ausschnitt des phylogenetischen Baums zu der 5'UTR Analyse. Jeweils an den Knoten kann die „bootstrap value“ abgelesen werden. Die Länge der einzelnen Äste ist äquivalent zur genetischen Distanz. Die Isolate, die mit Bn gekennzeichnet sind, stammen aus der Kohorte aus Bonn, die mit sp gekennzeichneten Isolate aus der Kohorte aus Barcelona. Die ID-Nummer, die mit U beginnt ist eine Referenzsequenz aus der Onlinedatenbank „GenBank“.

Die verschiedenen Genotypen von GBV-C sind unterschiedlich über die verschiedenen Ethnien verteilt. Hierbei stammen die Patienten, die mit einem GBV-C-Genotyp 1 Isolat infiziert sind, hauptsächlich aus Europa (71%) und Afrika (29%), die Patienten, die mit einem GBV-C Genotyp 2 Isolat infiziert sind zu einem überwiegenden Teil aus Europa (94%), die beiden Patienten, die mit dem GBV-C Genotyp 3 Isolat infiziert sind aus Europa (100%) und die Patienten, die mit dem GBV-C Genotyp 5 Isolat infiziert sind zu 100% aus Afrika (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Verteilung der GBV-C-Genotypen über die Ethnien in der Gesamtkohorte aus Bonn/Barcelona

	GBV-C-Genotyp							
	GBV-C Genotyp 1		GBV-C Genotyp 2		GBV-C Genotyp 3		GBV-C Genotyp 5	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Afrikaner	4	29,0%	1	1,0%	0	0,0%	6	100%
Asiate	0	0,0%	2	2,0%	0	0,0%	0	0,0%
Kaukasier	10	71,0%	99	94%	2	100%	0	0,0%
Lateinamerikaner	0	0,0%	3	3,0%	0	0,0%	0	0,0%
Gesamt	14	100,0%	105	100,0%	2	100,0%	6	100%

Interessanterweise gruppieren die Genotyp 5 Isolate der Kohorte aus Bonn in einem separaten Cluster, der einen neuen GBV-C Genotyp 5 Subtyp darstellen könnte. Der erforderliche Wert von 700 (70%) für den „Bootstrap-value“ (bei 1000 Wiederholungen), der eine formale Definition eines neuen Genotyps erlauben würde, wurde aber nicht erreicht. In 4.5.2 wird noch einmal genauer darauf eingegangen (siehe Abbildung 4.5).



Der GBV-C Genotyp 3 wird aufgrund der geringen Anzahl der Genotyp 3 Isolate von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Wie in Tabelle 4.10 und Abbildung 4.6 zu sehen, unterscheiden sich die GBV-C Genotyp 1 Isolate in ihrem Einfluss auf die CD4⁺ T-Zellzahl von den Isolatzen des GBV-C Genotypen 2:

Tabelle 4.10: Einfluss der Genotypen auf die CD4⁺ T-Zellzahl

	GBV-C-Genotyp					p ^{**}
	HIV ⁺ / GBV-C ⁻	HIV ⁺ / GBV-C-E2 Ak. ⁺	HIV ⁺ /GBV-C Genotyp 1 ⁺	HIV ⁺ /GBV-C Genotyp 2 ⁺	HIV ⁺ /GBV-C Genotyp 5 ⁺	
CD4⁺ T-Zellzahl (abs./µl)	475	484	279 ^a	449	375	p=0,004
95% Konfidenzintervall	(445-506)	(441-528)	(206-353)	(406-492)	(82-667)	
HIV-Viruslast (Kop./ml)	12.604	38.647	9.196	15.955	15.033	n.s.
95% Konfidenzintervall	(6.650- 18.557)	(8.601- 68.693)	(1.623-16.770)	(3.663-28.246)	(0-46.184)	

** statistische Signifikanz im Kruskal Wallis Test für alle Gruppen

a: HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁻: p=0,001

HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺ vs. HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺: p=0,003

HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: p=0,004

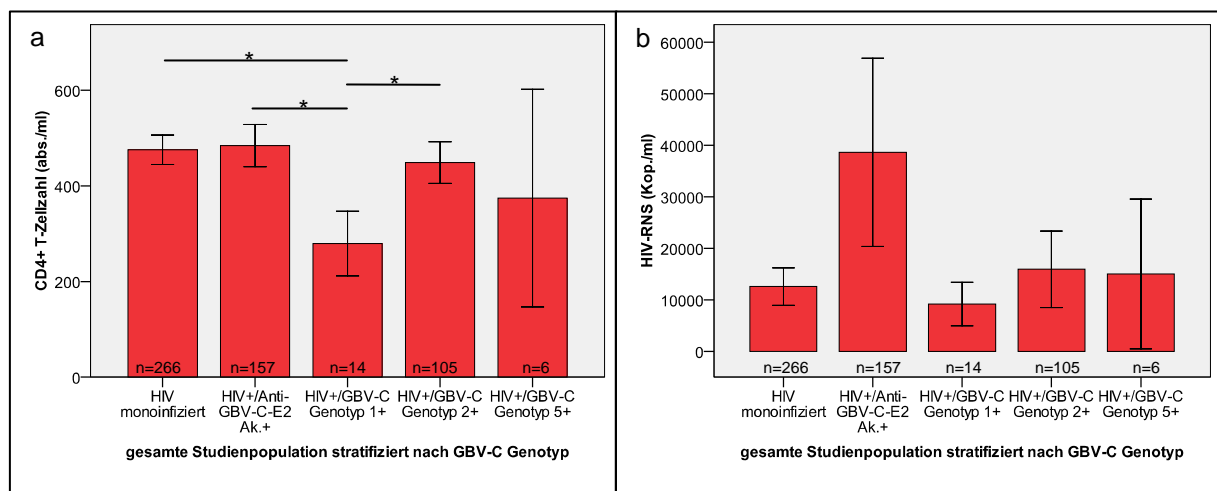


Abbildung 4.6. Abbildung 4.6a zeigt die absolute CD4⁺ T-Zellzahl, Abbildung 4.6b die HIV-Viruslast bei HIV monoinfizierten, GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten und den jeweils mit den GBV-C Genotypen 1, 2 und 5 koinfizierten Patienten.

Patienten mit einer GBV-C 1 Koinfektion haben signifikant niedrigere absolute CD4⁺ T-Zellzahlen (p=0,004, siehe Abbildung 4.6). Dies weist auf einen eher ungünstigen Einfluss einer Koinfektion mit GBV-C Genotyp 1 Isolaten hin. Einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der HIV-Viruslast konnte nicht beobachtet werden.

4.2 Unterschiede in den Serumspiegeln von IP-10 und IFN- γ in Seren HIV monoinfizierter und HIV/GBV-C koinfizierter Patienten

In einigen Studien wurde ein Einfluss der GBV-C-Infektion auf die Expression bzw. Serumkonzentration verschiedener Zytokine beobachtet (Nunnari et al. 2003; Lalle et al. 2008). Um zu überprüfen, ob diese Effekte in der eigenen Studienpopulation bestätigt werden können, wurden MIP-1 α , MIP-1 β (Liganden des HIV-Korezeptors CCR5), IFN- γ und IL-12 (Repräsentation des Th1-Zytokinprofils) und IP-10 (ein Chemokin für Th1-Zellen) in den Seren einer Stichprobe von 49 HIV bzw. 56 HIV/GBV-C koinfizierten Patienten bestimmt, die zufällig ausgewählt wurden. Als Referenz wurden die Serumspiegel von MIP1 α , MIP1 β IFN- γ , IL-12 und IP-10 bei 10 gesunden Probanden gemessen.

Eine Übersicht über die Stichprobe im Vergleich zur gesamten Studienpopulation (564 Patienten mit vollständigen virologischen und immunologischen Daten) zeigen die Tabellen 4.11 und 4.12.

Tabelle 4.11: Vergleich der klinischen Parameter der Zytokinanalyse zur ausgewählten Stichprobe mit der gesamten Studienpopulation

		Stichprobenvergleich			
		Stichprobe Zytokinanalyse		gesamte Studienpopulation	
		Anzahl	%*	Anzahl	%
Geschlecht	männlich	86	81,9%	428	75,9%
	weiblich	19	18,1%	136	24,1%
Ethnie	Afrikaner	14	13,3%	57	10,1%
	Asiate	2	1,9%	12	2,1%
	Kaukasier	87	82,9%	483	85,6%
	Lateinamerikaner	2	1,9%	12	2,1%
HIV-Transmission	MSM	47	44,8%	262	46,5%
	Heterosexuelle Kontakte	34	32,4%	165	29,3%
	Blut/Blutkonserven	4	3,8%	22	3,9%
	ivdu	17	16,2%	93	16,5%
	unbekannt	3	2,9%	22	3,9%
CDC Stadien (ABC)	CDC Stadium A	61	58,1%	312	55,3%
	CDC Stadium B	14	13,3%	111	19,7%
	CDC Stadium C	30	28,6%	141	25,0%
Opp. Infektionen	keine opp. Infektion	80	76,2%	438	77,7%
	opp. Infektion	25	23,8%	126	22,3%

* Prozent innerhalb der Kohorte, bzw. der Stichprobe

Tabelle 4.12: Vergleich virologischer und immunologischer Parameter in der Zytokinanalyse zur ausgewählten Stichprobe mit der gesamten Studienpopulation

		Stichprobenvergleich			
		Stichprobe		Gesamte Studienpopulation	
		Anzahl	%*	Anzahl	%
HAART Status	mit HAART	34	32,4%	119	21,1%
	ohne HAART	71	67,6%	445	78,9%
HCV Infektionsstatus	HCV negativ	82	78,1%	435	77,1%
	HCV positiv	23	21,9%	129	22,9%
HIV-Viruslast	HIV-RNS<50 (Kop./ml)	43	41,0%	348	61,7%
	HIV-RNS>50 (Kop./ml)	62	59,0%	216	38,3%
Immunstatus	<200 (abs./ml)	25	23,8%	78	13,8%
CD4⁺ T- Zellen	>200 (abs./ml)	80	76,2%	486	86,2%
HIV-Viruslast (Kop./ml)**		66.450		20.611	
95% Konfidenzintervall***		(20.399-112.501)		(11.458-29.765)	
CD4⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		356		463	
95% Konfidenzintervall		(320-391)		(442-484)	
CD4⁺/CD8⁺ Ratio		0,46		0,55	
95% Konfidenzintervall		(0,40-0,51)		(0,53-0,58)	
CD8⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		1.000		979	
95% Konfidenzintervall		(871-1.129)		(936-1.022)	
HCV-Viruslast (Kop./ml)		4.763.614		4.087.122	
95% Konfidenzintervall		(0-10.719.825)		(2.374.370-5.799.875)	

* Prozent innerhalb der Kohorte, bzw. der Stichprobe

** Mittelwerte

*** 95% Konfidenzintervalle des Mittelwertes über die Subgruppen

Die Patienten und die gesunden Probanden verteilten sich in der Stichprobe wie folgt auf die einzelnen Subgruppen:

Tabelle 4.13: Verteilung der Patienten über die Subgruppen

	Häufigkeit	Prozent
HIV⁺	35	30,4%
HIV⁺/GBV-C⁺	56	48,7%
HIV⁺/GBV-C⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺	1	0,9%
HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺	13	11,3%
gesunde Probanden	10	8,7%
Gesamt	115	100,0%

Aufgrund der geringen Fallzahl wurde der einzige Patient, der gleichzeitig eine replikative HIV/GBV-C-Koinfektion und GBV-C-E2 Antikörper aufwies, nicht weiter berücksichtigt. Ebenfalls unberücksichtigt blieb die Koinfektion mit HCV, da in einer separaten Analyse sich keine Effekte von HCV auf die Serumspiegel nachweisen ließen (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, bestanden signifikante Unterschiede für die IFN- γ und IP-10 Serumspiegel zwischen HIV/GBV-C koinfizierten Patienten und anderen Patientengruppen. Der IP-10 Serumspiegel aller GBV-C infizierten Subgruppen war gegenüber den Serumspiegeln der gesunden Probanden signifikant erhöht ($p < 0,001$). Der IFN- γ Serumspiegel aller GBV-C negativen, mit HIV infizierten Subgruppen war gegenüber den gesunden Probanden und den Patienten mit replikativer GBV-C-Koinfektion signifikant erhöht ($p < 0,001$). Dabei bestanden keine signifikanten Unterschiede in den IFN- γ Serumspiegeln zwischen den Patienten mit replikativer GBV-C-Koinfektion und der gesunden Referenzgruppe.

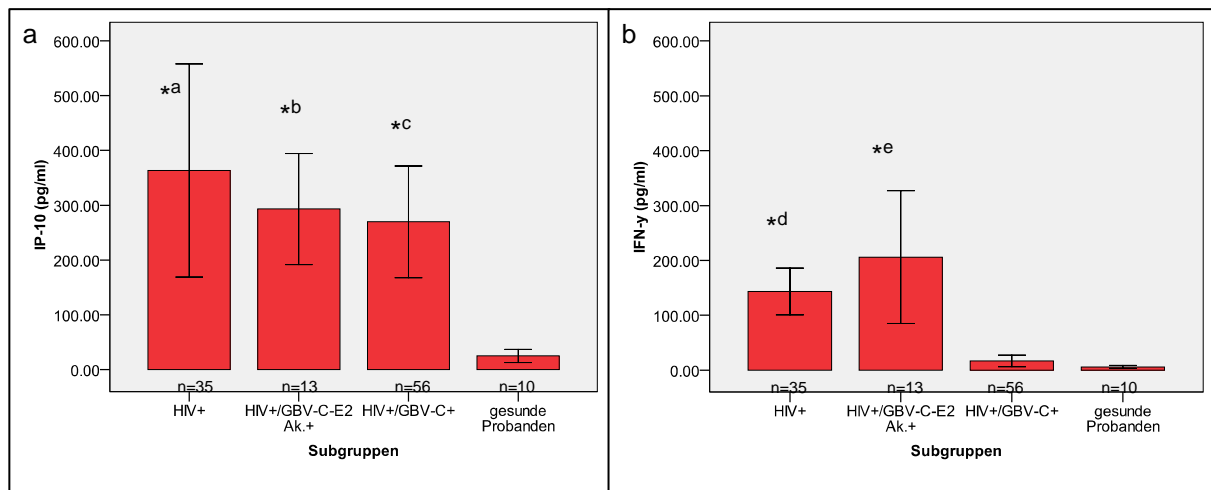


Abbildung 4.7: Serumspiegel von IP-10 (a) und IFN- γ (b) bei HIV monoinfizierten, HIV/GBV-C koinfizierten, HIV monoinfizierten/GBV-C-E2 Ak. positiven, und gesunden Probanden.

a: HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

b: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,002$

c: HIV⁺/GBV-C⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

d: HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: $p < 0,001$

HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

e: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: $p < 0,001$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,001$

4.2.1 Der Einfluss von HAART auf IFN- γ und IP-10 Serumspiegel

Um den Einfluss von HAART auf die Serumspiegel von MIP-1 α , MIP-1 β , IFN- γ , IP-10 und IL-12. zu überprüfen, wurden die Zytokinserumspiegel nach HAART stratifiziert. Wie aus den Abbildungen 4.8 und 4.9 ersichtlich bleiben die signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen für die Serumspiegel von IFN- γ und IP-10 bestehen, wenn nach HAART stratifiziert wird. Die IP-10 Serumspiegel aller Subgruppen sind gegenüber dem Serumspiegel der Referenzgruppe signifikant erhöht. Die IFN- γ Serumspiegel der GBV-C negativen Subgruppen ist gegenüber den HIV/GBV-C koinfizierten Gruppe sowie der Referenzgruppe signifikant erhöht, während der IFN- γ Serumspiegel der HIV/GBV-C koinfizierten Patienten sich nicht signifikant von dem Serumspiegel der Referenzgruppe unterscheidet.

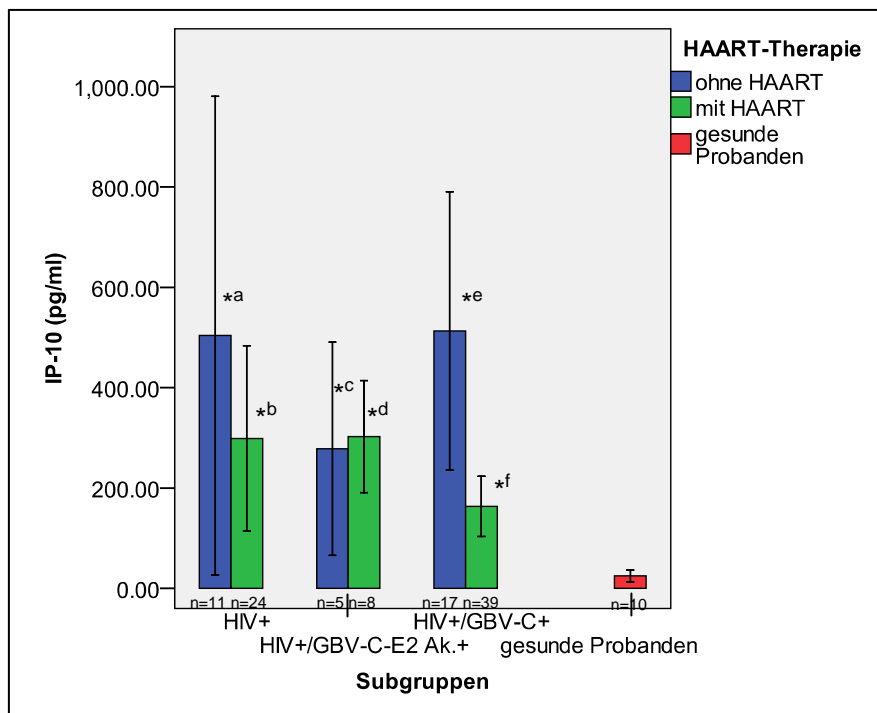


Abbildung 4.8: Serumspiegel von IP-10 bei HIV monoinfizierten, HIV/GBV-C koinfizierten, HIV monoinfizierten/ GBV-C-E2 Ak. positiven Patienten, und gesunden Probanden stratifiziert nach HAART.

- a: HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$
 b: HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,003$
 c: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,006$
 d: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$
 e: HIV⁺/GBV-C⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$
 f: HIV⁺/GBV-C⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,01$

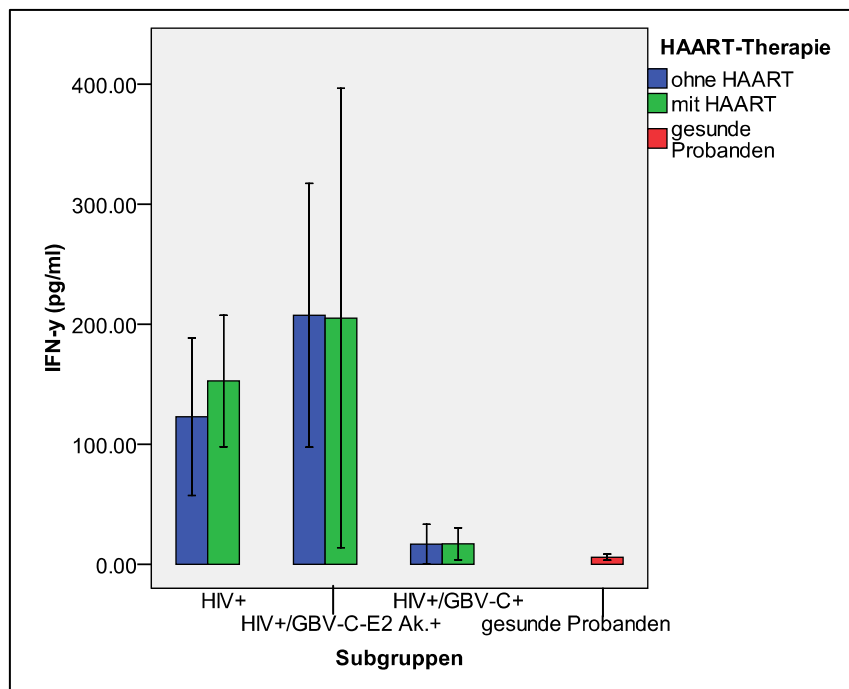


Abbildung 4.9: Serumspiegel von IFN- γ bei HIV monoinfizierten, HIV/GBV-C koinfizierten, HIV monoinfizierten/ GBV-C-E2 Ak. positiven, und gesunden Probanden stratifiziert nach HAART.

- a: HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: p=0,006
 HIV⁺ vs. gesunde Probanden: p=0,002
- b: HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: p<0,001
 HIV⁺ vs. gesunde Probanden: p<0,001
- c: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: p=0,004
 HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: p=0,004
- d: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: p=0,001
 HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: p=0,001

Es zeigten sich bei dieser Analyse keine Unterschiede für IP-10 und IFN- γ in Abhängigkeit von der HAART. Somit wurde, für die weiteren Auswertungen der GBV-C-Effekte in Abhängigkeit vom Genotyp, die HAART als Kofaktor nicht weiter berücksichtigt. Bei 52 der insgesamt 56 GBV-C positiven Patienten konnte der GBV-C-Genotyp bestimmt werden. Die einzelnen GBV-C-Genotypen waren wie folgt in der Stichprobe verteilt (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Verteilung der GBV-C-Genotypen in der Stichprobe

	Anzahl	%
GBV-C Genotyp 1	11	19,6%
GBV-C Genotyp 2	35	62,6%
GBV-C Genotyp 3	2	3,6%
GBV-C Genotyp 5	4	7,1%
GBV-C Genotyp nicht bestimmbar	4	7,1%
Gesamt	56	100%

Die IFN- γ Spiegel zeigten unabhängig vom GBV-C-Genotyp niedrige Werte bei allen GBV-C koinfizierten Patienten (siehe Abbildung 4.10). Anders verhielt es sich mit den IP-10 Serumspiegeln: Hier waren die IP-10 Serumspiegel der HIV monoinfizierten bzw. GBV-C-E2-Antikörper positiven Patienten, sowie die mit dem GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten signifikant gegenüber denen der Referenzgruppe erhöht, während die Serumspiegel der mit GBV-C Genotyp 5 koinfizierten Patienten sich nicht von denen der Referenzgruppe unterschieden. Die Serumspiegel der GBV-C Genotyp 2 koinfizierten Patienten waren signifikant niedriger als die der HIV monoinfizierten/GBV-C-E2 Antikörper positiven bzw. GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten (siehe Abbildung 4.10), und somit ebenfalls nahe an den Serumspiegeln der gesunden Probanden.

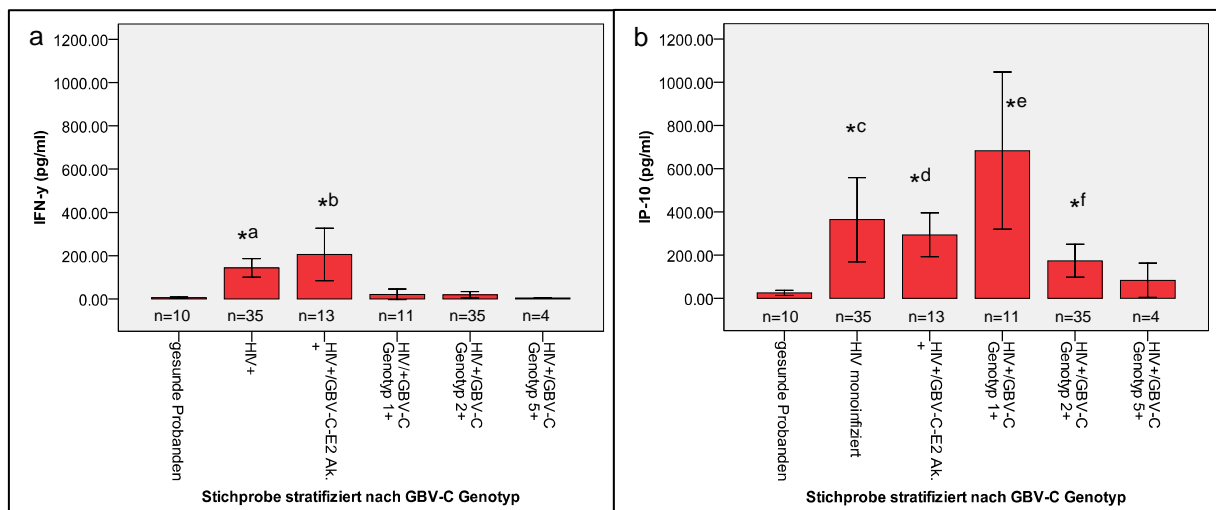


Abbildung 4.10: Zytokinspiegel (pg/ml) von IFN- γ (a) und IP-10 (b) in den Seren von gesunden Probanden, HIV monoinfizierten, HIV/GBV-C-E2 Ak. positiven, HIV/GBV-C Genotyp 1 koinfizierten, HIV/GBV-C Genotyp 2 koinfizierten und HIV/GBV-C Genotyp 5 koinfizierten Patienten.

a: HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺: $p = 0,04$

HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: $p < 0,001$

HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 5⁺: $p = 0,01$

b: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺: $p = 0,0018$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: $p < 0,001$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 5⁺: $p = 0,026$

c: HIV⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺: $p = 0,019$

HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: $p < 0,043$

d: HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: $p = 0,016$

HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 5⁺: $p = 0,0032$

e: HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺ vs. HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺: $p = 0,002$

HIV⁺/GBV-C Genotyp 1⁺ vs. gesunde Probanden: $p < 0,001$

f: HIV⁺/GBV-C Genotyp 2⁺ vs. gesunde Probanden: $p = 0,014$

4.2.2 Zusammenhänge zwischen GBV-C-Viruslast, IFN- γ , und IP-10 mit der HIV-Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl

Um die Frage zu klären, ob die beobachteten hohen IFN- γ Serumspiegel bei HIV monoinfizierten Patienten einen Effekt auf die HIV-Viruslast und die CD4⁺ T-Zellzahl haben, wurden alle Patienten je nach Höhe des Serumspiegels von IFN- γ in die Subgruppen

- „IFN- γ normal“ bzw.
- „IFN- γ erhöht“

eingeteilt, wobei der „Cut-Off“ für einen erhöhten Serumspiegel als Obergrenze des 95% Konfidenzintervalls der IFN- γ Serumspiegel bei gesunden Probanden (4,7pg/ml-8,88pg/ml) definiert wurde.

Die Patienten mit erhöhten IFN- γ Serumspiegeln, hatten auch gleichzeitig signifikant höhere IP-10 Serumspiegel. Zusätzlich hatten die Patienten, mit niedrigen IFN- γ Serumspiegeln eine signifikant niedrigere HIV-Viruslast im Vergleich zu den Patienten mit erhöhten IFN- γ Serumspiegeln (siehe Abbildung 4.11). Die Anzahl von Patienten mit niedrigen IFN- γ Serumspiegeln war in der Subgruppe der GBV-C koinfizierten Patienten im Vergleich mit den HIV monoinfizierten Patienten und den HIV/GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten signifikant erhöht (siehe Tabelle 4.15).

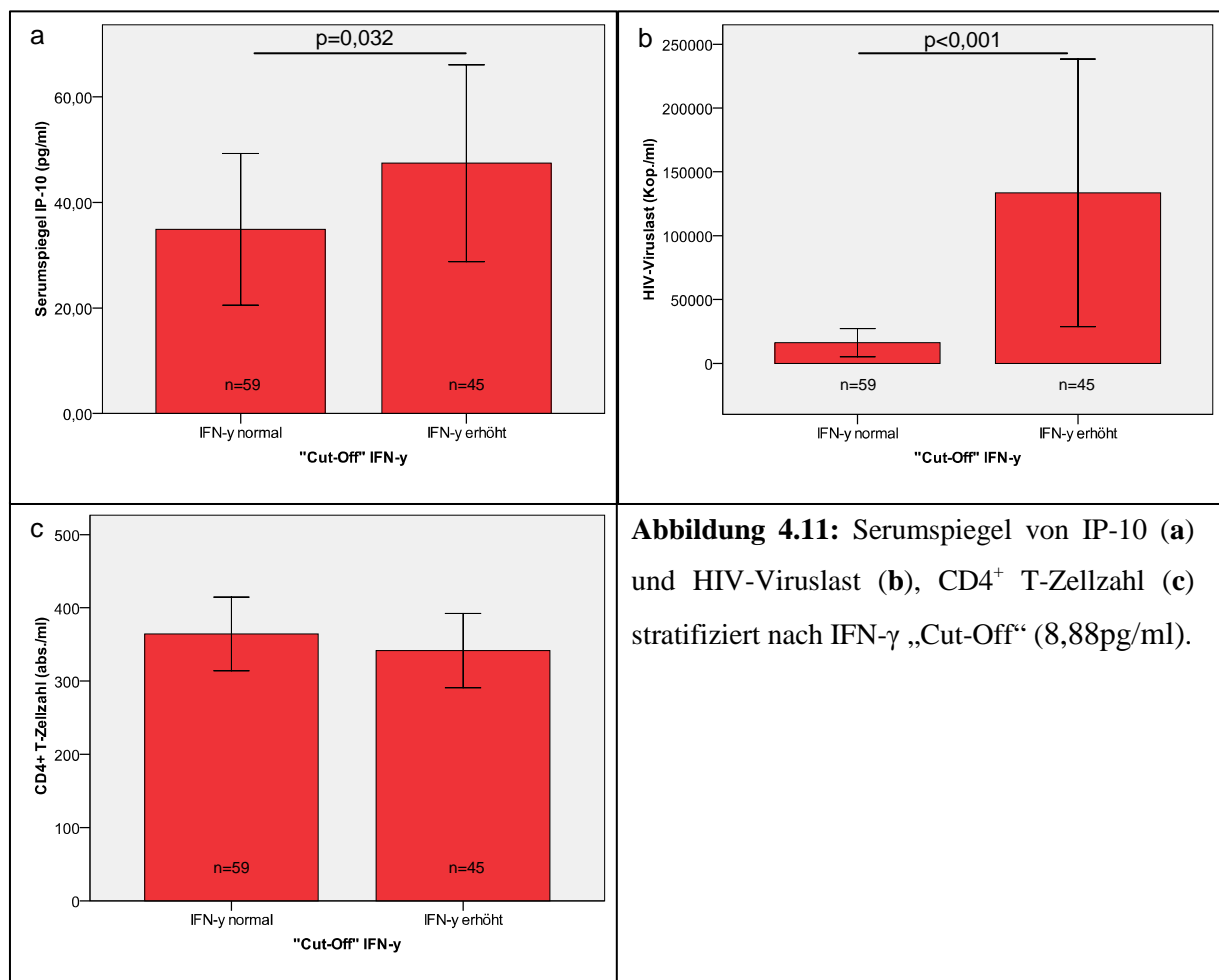


Abbildung 4.11: Serumspiegel von IP-10 (a) und HIV-Viruslast (b), CD4⁺ T-Zellzahl (c) stratifiziert nach IFN- γ „Cut-Off“ (8,88pg/ml).

Tabelle 4.15: Kreuztabelle für den Vergleich der Subgruppen hinsichtlich des IFN- γ „Cut-Offs“

	Subgruppen							
	HIV ⁺		HIV ⁺ /GBV-C-E2 Ak. ⁺		HIV ⁺ /GBV-C ⁺		gesunde Probanden	
	Anzahl	%*	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
IFN-γ normal	8	22.9%	3 ^a	23.1%	48 ^b	85.7%	9	90,0%
IFN-γ erhöht	27	77.1%	10	76.9%	8	14.3%	1	10,0%
Gesamt	35	100%	13	100%	56	100%	10	100%

* Prozent über die Subgruppen

IFN- γ Serumspiegel wurden als erhöht angesehen, wenn sie oberhalb des 95% Konfidenzintervalls (4,7pg/ml-8,88pg/ml) gesunder Probanden lagen

Signifikanz des Chi-Quadrat Tests für die Gruppen HIV⁺ HIV⁺/GBV-C⁺ und HIV⁺/GBV-C-E2 Ak.⁺:

a: HIV⁺ vs. HIV⁺/GBV-C⁺: p<0,001

HIV⁺ vs. gesunde Probanden: p<0,001

Bei 43 Patienten der Stichprobe konnte die GBV-C-Viruslast quantifiziert und mit den Serumspiegeln für IFN- γ und IP-10 verglichen werden.

Die GBV-C-Viruslast korrelierte invers mit den Serumspiegel von IP-10 (p=0,012) und mit der HIV-Viruslast (p=0,006) und der CD4⁺ T-Zellzahl (p=0,033, siehe Tabelle 4.16 und Abbildung 4.12).

Tabelle 4.16: Korrelation der GBV-C-Viruslast mit den Serumspiegeln von MIP-1 α MIP-1 β ,IFN- γ , IP-10 und IL-12, der HIV-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl

	MIP-1 α	MIP-1 β	IFN- γ	IP-10	IL-12	HIV-Viruslast	CD4 ⁺ T-Zellzahl
Korrelationskoeffizient*	0,143	0,388	-0,307	-,363	0,627	-0,391	0,308
Signifikanz**	0,526	0,068	0,331	0,012	0,568	0,006	0,033
Anzahl	47	47	47	47	47	47	47

* Korrelationskoeffizient R nach Pearson

** statistische Signifikanz der Korrelation nach Pearson

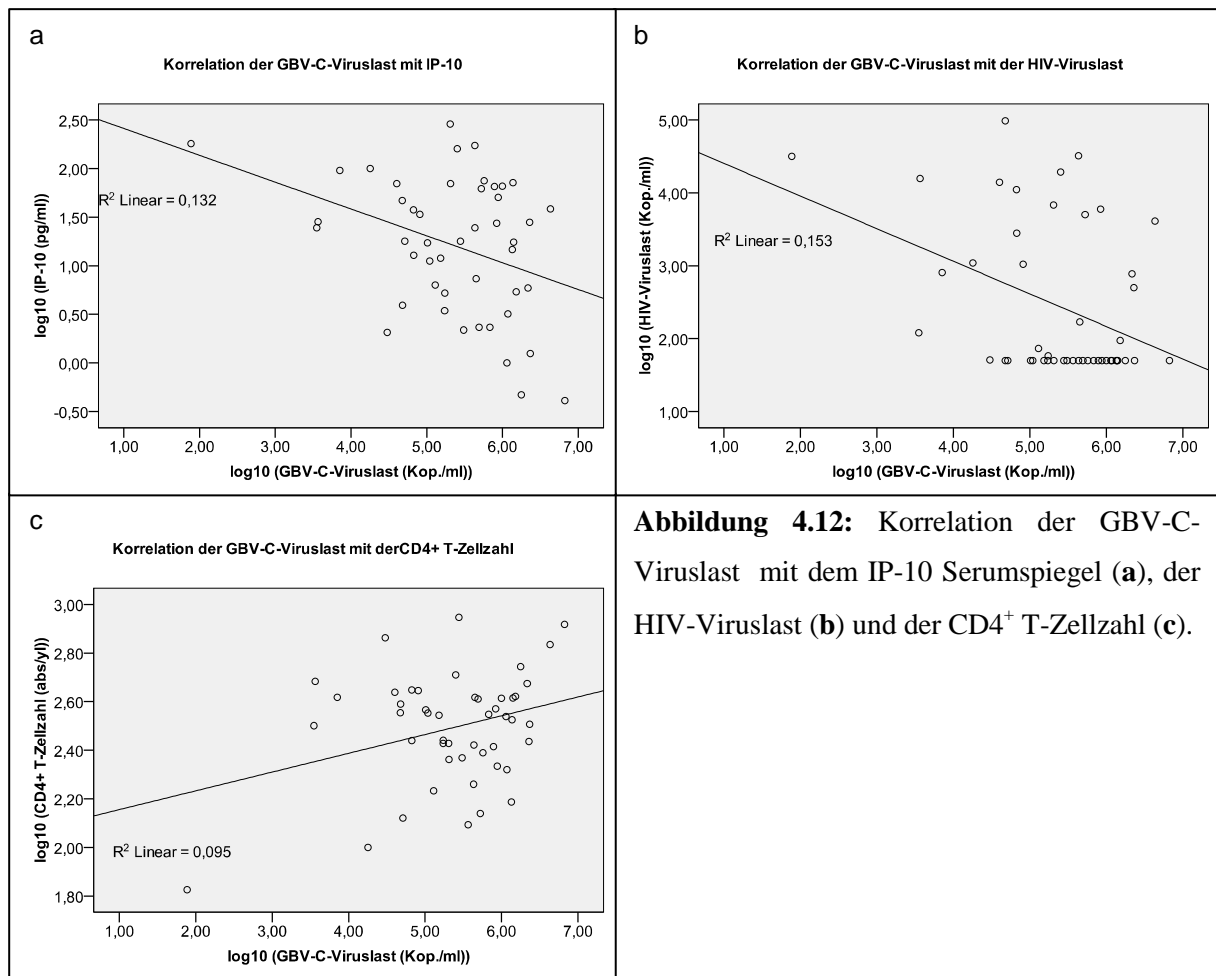


Abbildung 4.12: Korrelation der GBV-C-Viruslast mit dem IP-10 Serumspiegel (a), der HIV-Viruslast (b) und der CD4⁺ T-Zellzahl (c).

Ebenso korrelieren die HIV-Viruslast direkt und die CD4⁺ T-Zellzahl invers mit den Serumspiegeln von IP-10 (siehe Tabelle 4.17 und Abbildung 4.13)

Tabelle 4.17: Korrelation des IP-10 Serumspiegels mit der HIV-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl.

		HIV-Viruslast	CD4 ⁺ -T-Zellzahl
IP-10	Korrelationskoeffizient *	0,577	-0,329
	Signifikanz **	<0,001	0,024
	Anzahl	47	47

* Korrelationskoeffizient R nach Pearson

** statistische Signifikanz der Korrelation nach Pearson

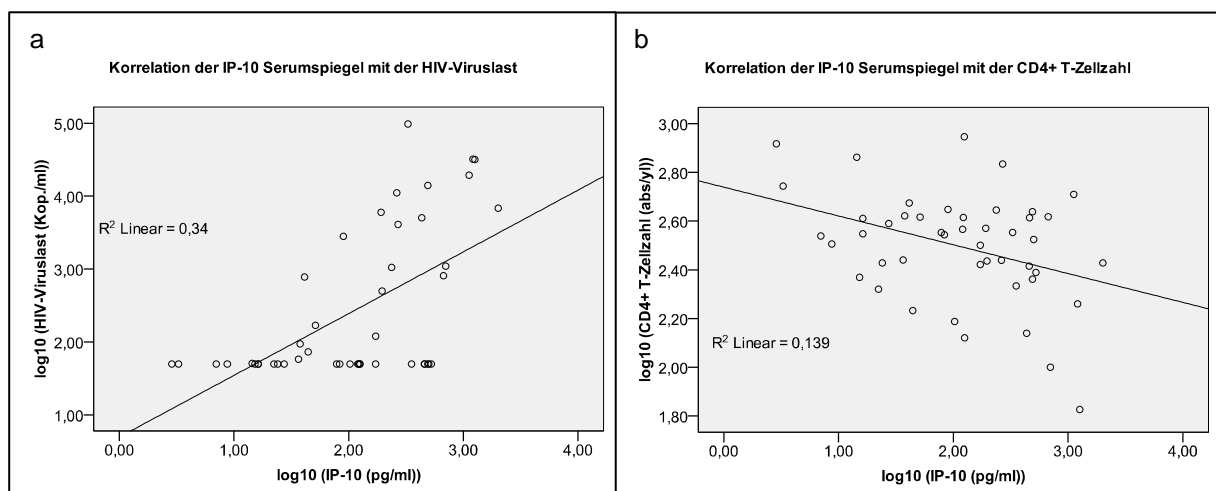


Abbildung 4.13: Korrelation der IP-10 Serumspiegel mit der HIV-Viruslast (a) und der CD4⁺ T-Zellzahl (b)

4.3 Messung der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten

In verschiedenen Arbeiten wurde postuliert, dass eine Koinfektion mit GBV-C zu einer verminderten Oberflächenexpression, der für den HI-Virus notwendigen CCR5- und CXCR4-Korezeptoren führt. Diese Hypothese wurde anhand der vorliegenden Studienpopulation überprüft. Hierfür wurde bei einer repräsentativen Stichprobe von 156 HIV positiven Patienten die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 auf den CD4- und CD8-positiven Zellen gemessen. Eine Übersicht über die Stichprobe und ein Vergleich zu der Gesamt-Kohorte aus Bonn (376 Patienten mit vollständigen virologischen Daten) zeigen die Tabellen 4.18. und 4.19. Die Analyse der Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 beschränkte sich aus methodischen Gründen auf die Kohorte aus Bonn. Der Vergleich in den Tabellen 4.18 und 4.19 zeigt, dass die ausgewählte Stichprobe für die Kohorte aus Bonn repräsentativ war.

Tabelle 4.18: Vergleich der klinischen Parameter der CCR5- und CXCR4-Analyse zur ausgewählten Stichprobe mit der Kohorte aus Bonn

		Stichprobenvergleich			
		Stichprobe		Kohorte aus Bonn	
		Anzahl	%*	Anzahl	%
Geschlecht	männlich	114	73,1%	284	75,5%
	weiblich	42	26,9%	92	24,5%
Ethnie	Afrikaner	30	19,2%	54	14,4%
	Asiate	4	2,6%	8	2,1%
	Kaukasier	120	76,9%	308	81,9%
	Lateinamerikaner	2	1,3%	6	1,6%
HIV-Transmission	MSM	83	53,2%	195	51,9%
	Heterosexuelle Kontakte	50	32,1%	113	30,1%
	Blut/Blutkonserven	6	3,8%	19	5,1%
	ivdu	11	7,1%	34	9,0%
	unbekannt	6	3,8%	15	4,0%
CDC Stadien (ABC)	CDC Stadium A	71	45,5%	184	48,9%
	CDC Stadium B	34	21,8%	97	25,8%
	CDC Stadium C	51	32,7%	95	25,3%
Opp. Infektionen	keine opp. Infektion	107	68,6%	283	75,3%
	opp. Infektion	49	31,4%	93	24,7%

* Prozent innerhalb der Kohorte, bzw. Stichprobe

Tabelle 4.19: Vergleich virologischer und immunologischer Parameter in der CCR5- und CXCR4-Analyse zur ausgewählten Stichprobe mit der gesamten Studienpopulation

		Stichprobenvergleich			
		Stichprobe		Kohorte aus Bonn	
		Anzahl	% *	Anzahl	%
HAART-Status	ohne HAART	40	25,6%	104	27,7%
	mit HAART	116	74,4%	272	72,3%
HCV Infektionsstatus	HCV negativ	136	87,2%	313	83,2%
	HCV positiv	20	12,8%	63	16,8%
HIV-Viruslast	HIV-RNS<50(Kop./ml)	99	63,5%	218	58,0%
	HIV-RNS>50(Kop./ml)	57	36,5%	158	42,0%
Immunstatus	<200 (abs./ml)	25	16,0%	58	15,4%
CD4⁺ T- Zellen	>200 (abs./ml)	131	84,0%	318	84,6%
HIV-Viruslast (Kop./ml) **		12.869		15.862	
95% Koinfidenzintervall ***		(7.386-18.352)		(11.017-20.707)	
CD4⁺ T-Zellzahl (abs./µl)		445		453	
95% Koinfidenzintervall		(403-486)		(427-480)	
CD4⁺/CD8⁺ Ratio		0,52		0,56	
95% Koinfidenzintervall		(0,47-0,57)		(0,52-0,59)	
HCV-Viruslast (Kop./ml)		7.094.969		5.894.440	
95% Koinfidenzintervall		(1.626.423-12.563.516)		(3.562.740-8.226.148)	

* Prozent innerhalb der Kohorte, bzw. Stichprobe

** Mittelwerte

*** 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes

Da die CCR5- Δ 32 Mutation die Expression von CCR5 auf der Oberfläche von CD4 und CD8 positiven Zellen beeinflusst, war es notwendig, die Patienten der Stichprobe auf das Vorhandensein dieser Mutation mittels der LightCycler Methode aus 3.9.1 zu überprüfen. Insgesamt 145 der 156 Patienten konnten auf das Vorhandensein dieser Mutation überprüft werden. 16 (11,0%) der 145 untersuchten Patienten waren heterozygote Träger des CCR5- Δ 32 Allels, kein Patient war homozygot für das CCR5- Δ 32 Allel (siehe Tabelle 4.20).

Tabelle 4.20: Verteilung der CCR5-Δ32 Mutation in der Stichprobe

		CCR5-Δ32 Mutation		
		Wildtyp	Mutante	Gesamt
Stichprobe	Anzahl	129	16	145
CCR5/CXCR4 Analyse	%	89,0 %	11,0%	100%

Erwartungsgemäß war die die Expression von CCR5 auf den Oberflächen von CD4 und CD8 positiven T-Zellen bei heterozygoten Träger der CCR5-Δ32 Mutation signifikant erniedrigt ($p=0,012$ für CD4⁺ T-Zellen und $p<0,001$ für CD8⁺ T-Zellen), während die CXCR4 Oberflächenexpression nicht verändert war (siehe Abbildung 4.14).

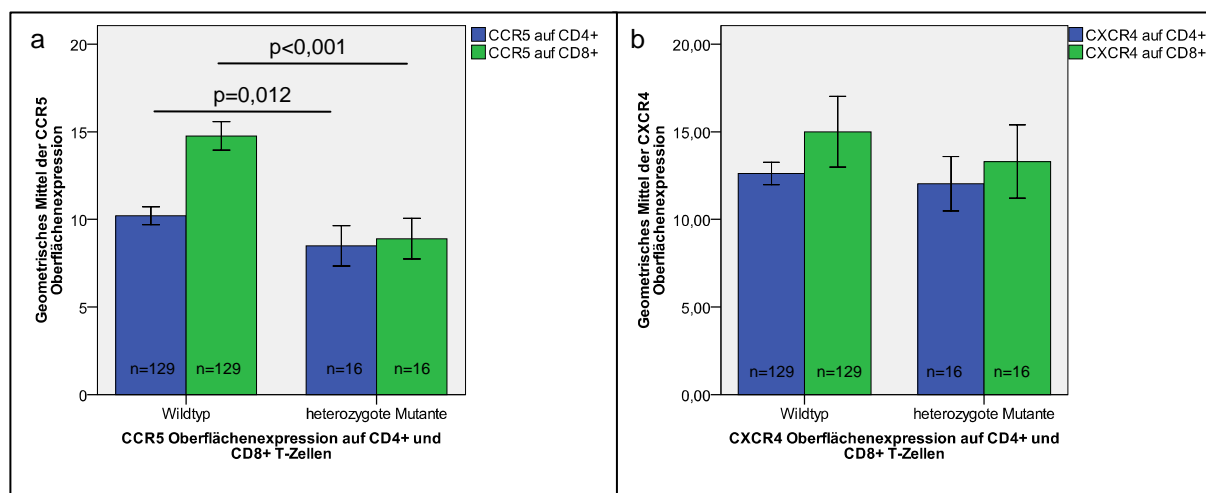


Abbildung 4.14: Expression von CCR5 (a) und CXCR4 (b) auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Vorliegen einer CCR5-Δ32 Deletion. Die geometrischen Mittel der CCR5 Oberflächenexpression lagen bei Patienten mit einer CCR5-Δ32 Mutation auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen signifikant niedriger als Patienten mit dem CCR5-Wildtyp, während für CXCR4 keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Patienten mit heterozygotem CCR5-Δ32 Genotyp (n=16) von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

4.3.1 Die CCR5- und CXCR4-Oberflächenexpression auf CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der CD4⁺ T-Zellzahl

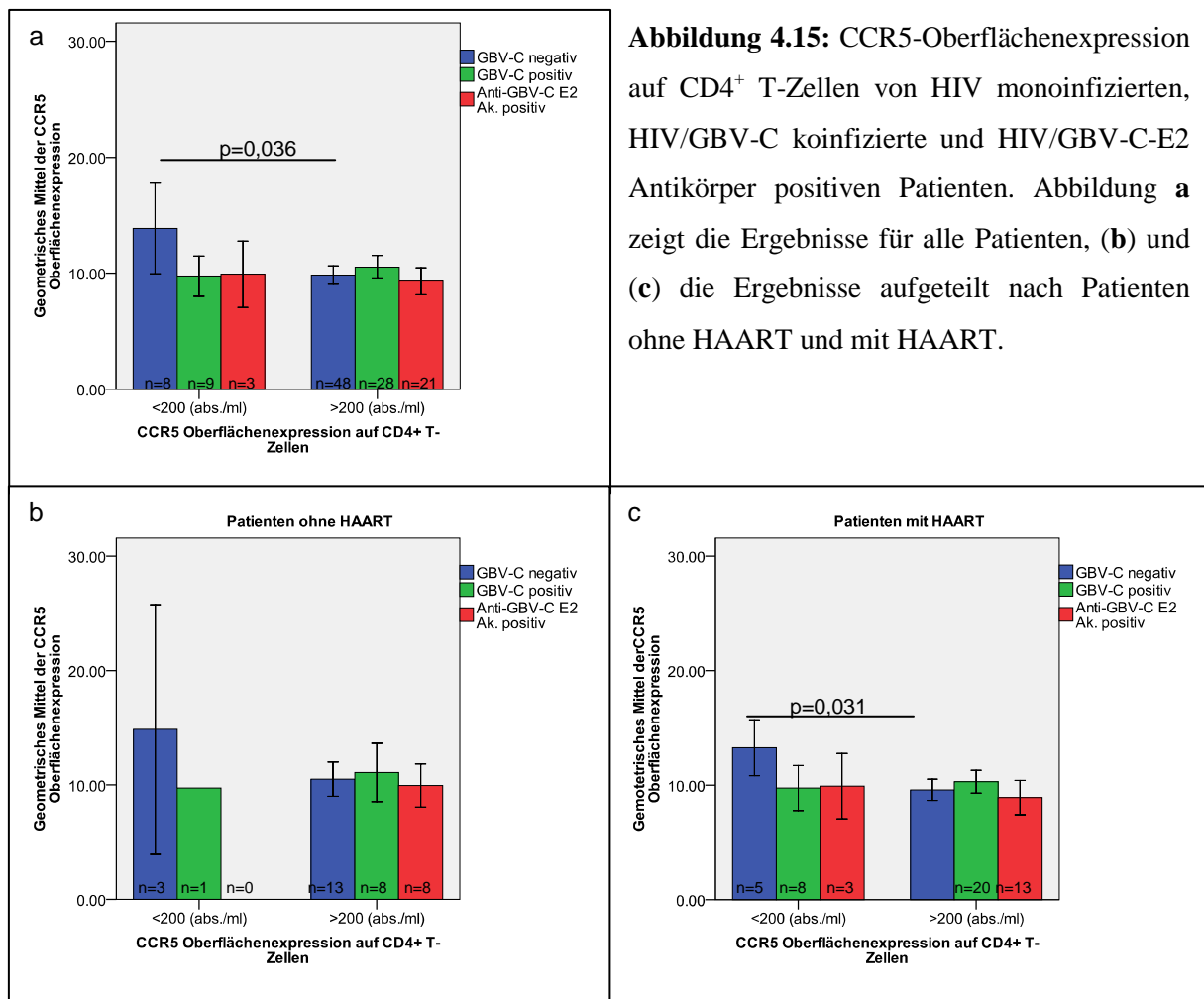
Es wurde in einigen Arbeiten eine Korrelation zwischen der Expression der HIV-Korezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen und der Abnahme der CD4⁺ T-Zellzahl postuliert (Reynes et al., 2001). Deshalb wurde in der Stichprobe die CCR5 und CXCR4 Oberflächenexpression auf den CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der CD4⁺ T-Zellzahl untersucht.

Dazu wurden die Patienten in die beiden Untergruppen CD4⁺ T-Zellzahl/ μ l \geq 200 versus CD4⁺ T-Zellzahl/ μ l $<$ 200 (fortgeschrittene Immundefizienz) stratifiziert und dann je nach GBV-C-Koinfektionsstatus getrennt betrachtet. Die HCV koinfizierten Patienten konnten aufgrund ihrer geringen Anzahl (n=12) in den einzelnen Subgruppen nicht weiter berücksichtigt werden.

4.3.1.1 CCR5-Oberflächenexpression auf CD4 positiven T-Zellen in Abhängigkeit vom GBV-C-Replikationsstatus

Bei getrennter Analyse der Subgruppen, je nach Status einer GBV-C-Koinfektion, zeigte sich eine signifikant erhöhte CCR5-Oberflächenexpression auf den CD4⁺ T-Zellen der HIV monoinfizierten Patienten, wenn die CD4⁺ T-Zellzahl unter 200 Zellen/ μ l lagen (p=0,036). Auch unter HAART konnte eine Hochregulierung von CCR5 auf CD4 positiven T-Zellen für die HIV monoinfizierten Patienten (CD4⁺ T-Zellzahl $<$ 200 Zellen/ μ l) beobachtet werden (p=0,031). Diese Hochregulierung von CCR5 konnte bei den CD4 positiven Zellen der GBV-C positiven und GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten nicht nachgewiesen werden.

Für HIV monoinfizierte Patienten mit weniger als 200 CD4⁺ T-Zellen/ μ l erreichte der Unterschied der erhöhten CCR5 Oberflächenexpression in der Gruppe ohne HAART aufgrund geringer Fallzahlen und erheblichen individuellen Schwankungen der Werte jedoch nicht das Signifikanzniveau von 0,05 (siehe Abbildung 4.15).



4.3.1.2 CXCR4-Oberflächenexpression auf CD4 positiven T-Zellen in Abhängigkeit vom GBV-C Replikationsstatus

Betrachtet man die CXCR4-Oberflächenexpression auf CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom Status der CD4⁺ T-Zellen, so zeigte sich bei HIV monoinfizierten Patienten kein signifikanter Unterschied in der CXCR4-Oberflächenexpression. Dagegen konnte eine signifikante Erniedrigung der CXCR4 Oberflächenexpression bei GBV-C koinfizierten Patienten mit fortgeschrittenem Immundefekt (CD4⁺ T-Zellzahl < 200 Zellen/ μ l, siehe Abbildung 4.16) beobachtet werden.

Bei isolierter Betrachtung von Patienten mit HAART war die Oberflächenexpression von CXCR4 auf CD4 positiven T-Zellen bei den HIV/GBV-C koinfizierten Patienten weiterhin signifikant erniedrigt, während bei Patienten ohne HAART die CXCR4 Oberflächenexpression nur bei einem einzigen GBV-C koinfizierten Patienten gemessen

werden konnte und deshalb keine statistische Auswertung möglich war (siehe Abbildung 4.16).

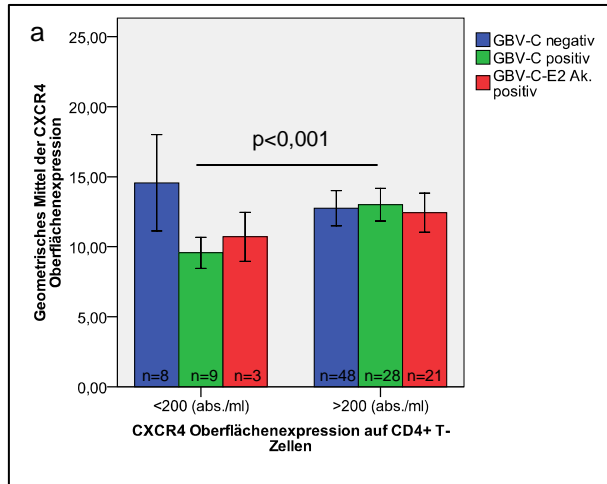
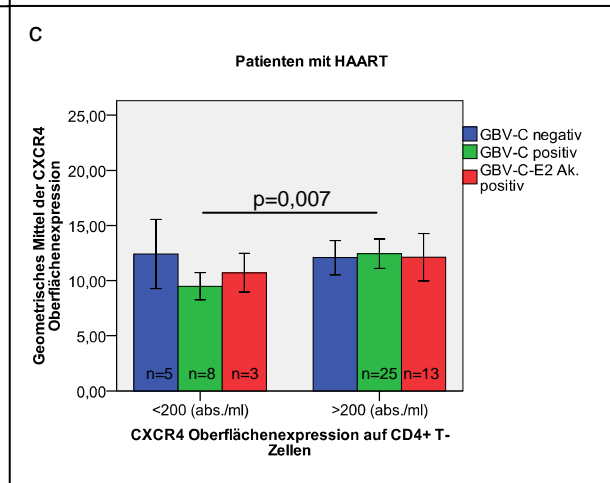
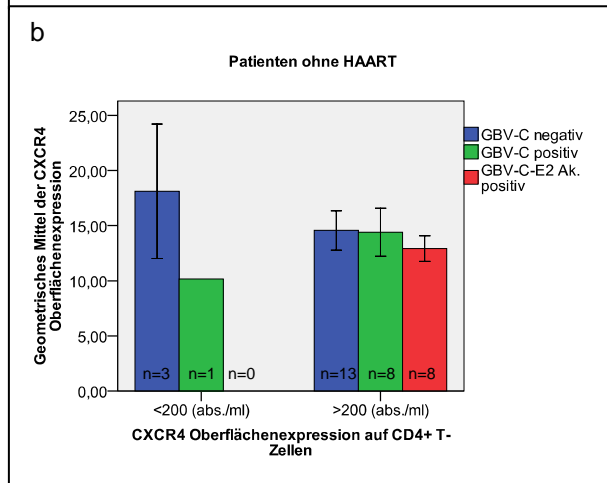


Abbildung 4.16:

CXCR4 Oberflächenexpression auf CD4⁺ T-Zellen bei HIV monoinfizierten, HIV/GBV-C koinfizierten und HIV/GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten (a). Die Ergebnisse wurden aufgeteilt nach Patienten ohne HAART (b) und Patienten mit HAART (c).



Bei 32 der 37 GBV-C positiven Patienten aus der Stichprobe konnte die GBV-C-Viruslast mit Hilfe der LC-Methode aus 3.3.3 quantitativ bestimmt werden. Der signifikant inverse Zusammenhang zwischen der GBV-C- und HIV-Viruslast ($p=0,033$) so wie die Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der $CD4^+$ T-Zellzahl ($p=0,027$) aus 4.1.3 bestätigte sich auch in der Stichprobe (siehe Abbildung 4.17).

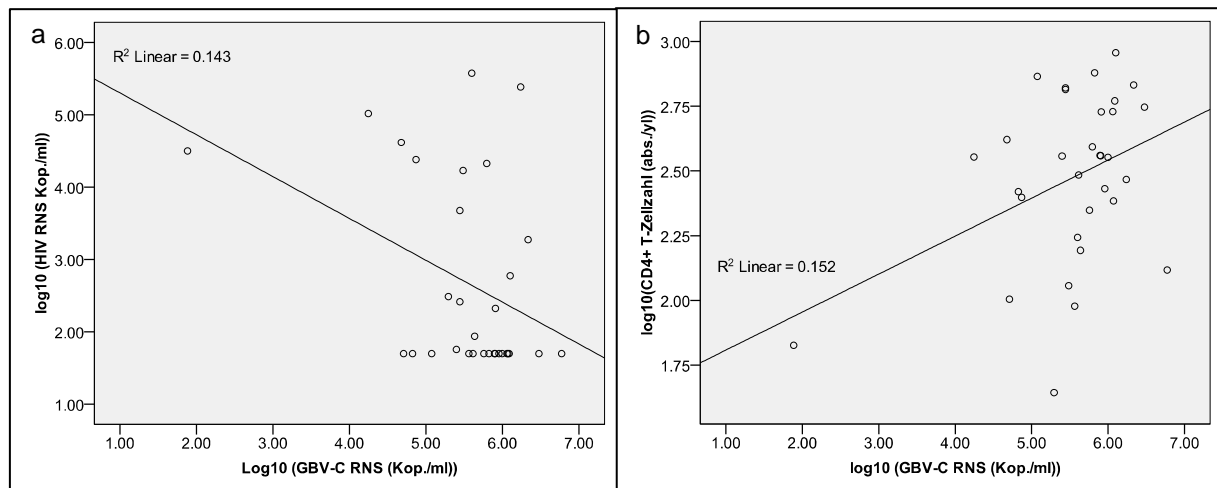


Abbildung 4.17: Korrelationen zwischen der GBV-C Viruslast und der HIV Viruslast (**a**) bzw. der $CD4^+$ T-Zellzahl (**b**) in der Stichprobe.

Aufgrund des schlechten Immunstatus und der damit verbundenen geringen Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen bei Patienten, die mit dem GBV-C Genotyp 1 Isolat koinfiziert waren, konnte eine Genotyp-abhängige Analyse der CCR5- und CXCR4-Oberflächenexpression nicht durchgeführt werden (vgl. 4.1.5).

4.4 Stimulation von RANTES mit rekombinantem GBV-C-E2 und GBV-C-Viruspartikeln

Als möglicher Mechanismus für den positiven Einfluss einer GBV-C-Koinfektion auf den Verlauf der HIV-Erkrankung wird eine erhöhte RANTES-Sekretion diskutiert, die durch Bindung von GBV-C-Hüllprotein E2 an CD81 induziert werden könnte (Nattermann et al. 2003). Die Bestimmung der Zytokinspiegel von RANTES in Seren ist bis dato nicht zuverlässig möglich. Um dennoch zu überprüfen, ob GBV-C RANTES zu stimulieren vermag, wurden Stimulationsexperimente mit PBMCs gesunder Probanden durchgeführt (siehe 3.8).

In drei unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde untersucht, ob die gebundenen GBV-C-Viruspartikel unterschiedlicher, mit GBV-C infizierter Patienten differentielle RANTES Sekretion induzieren. Hierzu wurden je 3 Seren der GBV-C Genotypen 1, 2 und 5 eingesetzt. In diesen Experimenten konnte eine signifikante Induktion der RANTES Sekretion durch GBV-C/HIV koinfizierte Seren im Vergleich zu HIV monoinfizierte Seren ($p=0,02$) bzw. der Medium Kontrolle ($p=0,005$) nachgewiesen werden. Eine zu den Seren äquivalente Induktion von RANTES konnte auch bei der Verwendung von rekombinantem GBV-C-E2 Protein gefunden werden (siehe Abbildung 4.18).

Aufgeschlüsselt nach dem GBV-C-Genotyp konnte eine signifikant erhöhte RANTES Sekretion in Zellkulturüberständen gemessen werden, in denen die PBMCs mit Seren aus Patienten stimuliert wurden die mit dem GBV-C Genotyp Isolat 2 bzw. 5 infiziert waren ($p=0,028$ für GBV-C Genotyp 2 vs. HIV monoinfiziert, $p=0,048$ für GBV-C Genotyp 2 vs. Mediumprobe und $p=0,019$ für GBV-C Genotyp 5 vs. HIV monoinfiziert und $p=0,03$ für GBV-C Genotyp 5 gegen Mediumprobe, siehe Abbildung 4.18). Die Zellkulturüberstände, die mit Seren der GBV-C Genotyp 1 Isolate stimuliert worden waren, zeigten dagegen keine signifikant erhöhte RANTES Sekretion (siehe Abbildung 4.18).

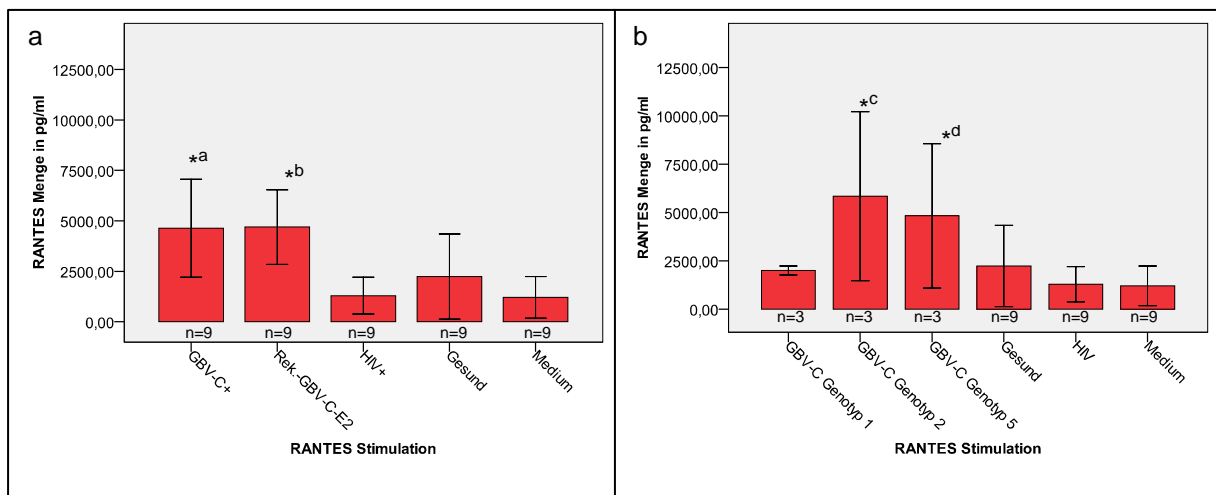


Abbildung 4.18: RANTES Induktion in Zellkulturüberständen. **4.18a:** Die RANTES Sekretion wurde stimuliert mit GBV-C/HIV-RNS positiven Seren, mit rekombinantes GBV-C E2 Protein, mit HIV positiven Seren, mit Seren gesunder Probanden und mit Medium. Eine signifikante RANTES Sekretion konnte mit den GBV-C/HIV koinfizierten Seren und dem rekombinantes GBV-C E2 Protein induziert werden. **4.18b:** RANTES Stimulation aufgeschlüsselt nach GBV-C Genotypen. Signifikant erhöht war die RANTES Sekretion bei den Seren, die mit dem GBV-C Genotypen 2 bzw. 5 Isolat infiziert waren gegenüber den Proben, die mit Seren HIV monoinfizierter Patienten oder mit Medium stimuliert waren.

a: GBV-C⁺ vs. HIV⁺: p=0,02

GBV-C⁺ vs. Medium: p=0,005

b: rekombinantes GBV-C-E2 Protein vs. HIV⁺: p=0,021

rekombinantes GBV-C-E2 Protein vs. Medium: p=0,005

c: GBV-C Genotyp2⁺ vs. HIV⁺: p=0,028

GBV-C Genotyp2⁺ vs. Medium: p=0,048

d: GBV-C Genotyp5⁺ vs. HIV⁺: p=0,019

GBV-C Genotyp5⁺ vs. Medium: p=0,03

4.5 Analyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz

Mc Linden et. al konnten mit Hilfe eines Antikörperassays eine mögliche Protein-Bindungsstelle des GBV-C-Virus innerhalb des E2 Glykoproteins identifizieren (Aminosäure-Position 277-293 des GBV-C-E2 Proteins), die für die Bindung des GBV-C-Virus an die Zielzelle von Bedeutung sein könnte. Mutationen in dieser „*immunodominant antigenic site*“ führten zu unterschiedlichen Bindungseigenschaften rekombinanter GBV-C-E2 Proteine an MOLT-4 Zellen (McLinden et al. 2006).

Genotyp-spezifische Polymorphismen in dieser 17 Aminosäure langen Sequenz könnten somit zu unterschiedlichen Bindungseigenschaften verschiedener GBV-C Isolate mit der Zielzelle führen und einen Hinweis liefern, welcher die von uns beobachteten GBV-C-Genotyp-abhängigen Effekte auf die IP-10 Serumspiegel, die RANTES-Induktion und die signifikant unterschiedliche Anzahl der CD4⁺ T-Zellen erklären könnte. Deshalb wurde die Aminosäuresequenz dieser „*immunodominant antigenic site*“ auf Genotyp-spezifische Mutationen hin untersucht.

Neben definierten Bindungsstellen kann der Grad der Glykosylierung und Phosphorylierung eines Proteins Funktion bzw. Bindungseigenschaften beeinflussen, weshalb die komplette 334 Aminosäuren umfassende Sequenz mit Hilfe der Onlinedatenbank www.predictprotein.org nach Glykosilierungs-bzw. Phosphorylierungsstellen gescannt und an diesen Positionen auf Genotyp-abhängige Mutationen hin durchsucht wurde.

4.5.1 Mutationsanalyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz

Zur Durchführung der Sequenzanalyse wurde ein 1058 Basen-Paar Segment des GBV-C-E2 Gens amplifiziert, sequenziert und mit dem Programm Bioedit[®] analysiert (siehe 3.5 und 3.7). Insgesamt wurde aus 17 GBV-C positiven Isolaten, bei denen der GBV-C-Genotyp über die Genotypisierung der GBV-C-5'UTR bestimmt worden ist, virale RNS isoliert und die GBV-C-E2 Region mit der unter 3.5 beschriebenen Methode amplifiziert. Die Sequenzierung selbst erfolgte bei SeqLab, Göttingen. Insgesamt konnte ein 1002 Basen-Paar (334 Aminosäuren) großer Abschnitt des GBV-C-E2 Proteins ausgewertet werden. Eine Übersicht über die analysierten GBV-C-E2 Isolate gibt die Tabelle 4.21:

Tabelle 4.21: Übersicht über die in der E2- Region sequenzierten GBV-C Isolate

GBV-C-Genotyp	Patient ID	Geschlecht	Ethnie	Herkunftsland
Genotyp 1	119	männlich	Kaukasier	Deutschland
	134	männlich	Kaukasier	Deutschland
	146	weiblich	Afrikaner	Nigeria
	338	männlich	Kaukasier	Deutschland
	252	weiblich	Kaukasier	Deutschland
	371	weiblich	Afrikaner	Kenia
Genotyp 2	007	männlich	Kaukasier	Deutschland
	139	männlich	Kaukasier	Polen
	151	weiblich	Kaukasier	Deutschland
	258	männlich	Kaukasier	Deutschland
	308	männlich	Kaukasier	Deutschland
Genotyp 3	133	männlich	Kaukasier	Deutschland
	320	weiblich	Kaukasier	Deutschland
Genotyp 5	131	weiblich	Afrikaner	Kamerun
	168	männlich	Afrikaner	Kenia
	193	weiblich	Afrikaner	Kenia
	269	männlich	Afrikaner	Kenia

In Abbildung 4.19 zu sehen ist die vermutlich für die Bindung des GBV-C-Virus an die Zielzelle wichtige Bindungsstelle (GGAGLTGGFYEPLVRRRC, Aminosäureposition 481-497). Diese Region war bei allen analysierten Isolaten, mit Ausnahme der Genotyp 2-Referenzsequenz U45966 (Aminosäureaustausch C 497 R) und der GBV-C Genotyp 3 Sequenz 133 (Aminosäureaustausch V 494 M), identisch.

	480	490
gen1AB003291	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AB013500-1	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
U36380-1	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(119)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(134)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(146)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(338)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(252)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp1(371)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AF121950	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2D90600	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AF031827	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2U45966	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AB003289	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AF104403	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2U63715	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AF309966	V X	GGAGX TGGFYEPLVRRCS
gen2U44402	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen2AF081782	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY196904-2	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp2(007)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp2(139)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp2(151)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp2(258)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp2(308)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87713	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3AF006500	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87715	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87712	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87708	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3AB008342	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3AB003290	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87711	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87263	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87714	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3D87710	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen3AB003293	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
U94695-3	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
D87709-3	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
D90601-3	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp3(133)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp3(320)	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen4AB018067	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen4AB003292	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
gen5AY949771-D50	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp5(131)	A L	GGAGLTGGFYEPLVXRCSS
GBV-C Genotyp5(168)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp5(193)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
GBV-C Genotyp5(269)	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951958-SA1-B155	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951962-SA5-B175	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951959-SA5-B157	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951976-SA5-L120A	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951967-SA5-B253	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951957-SA5-B149	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951965-SA5-B226	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951964-SA5-B190	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951968-SA5-B96	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951977-SA5-L121A	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951966-SA5-B243	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951963-SA5-B183	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951960-SA5-B161	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951955-SA5-B124	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951973-SA1-D62	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951972-SA1-D51	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951961-SA1-B172	A L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS
AY951969-SA1-D21	V L	GGAGLTGGFYEPLVRRCS

Abbildung 4.19 Ausschnitt der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz im Bereich der mutmaßlichen CD81-Bindungsstelle. Durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben ist die 17 Aminosäure umfassende „immunodominant antigenic site“. Die von uns sequenzierten Isolate sind mit einem roten Rahmen markiert. Die „leader“- Sequenz ist mit einem blauen Rahmen markiert. Der Genotyp der Referenzsequenzen ist durch einen Präfix *gen1-4*, Suffix *1-3* und Suffix *SA1* für Genotyp 1 und *SA5* für GBV-C Genotyp 5 gekennzeichnet. Das Symbol X steht für eine nicht identifizierte Aminosäure. Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die Aminosäureaustausche in der Genotyp 2 Referenzsequenz U45966 und der GBV-C Genotyp 3 Sequenz 133. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt nach der Nummerierung der Nukleotide, beginnend mit dem Start-Methionin als Aminosäureposition Position 1.

Mit Hilfe der Online Datenbank www.predictprotein.org konnten neun mögliche Phosphorylierungstellen und drei Glykosylierungsstellen im GBV-C-E2 Gen identifiziert werden (siehe Tabelle 4.22). Ebenso wie die „*immunodominant antigenic site*“ zeigten diese Proteinmotive keinerlei Genotyp-spezifische Mutationen in allen untersuchten E2 Aminosäuresequenzen (siehe Abbildung 4.20).

Tabelle 4.22: Übersicht der identifizierten Glykosylierung und Phosphorylierungsstellen im GBV-C-E2 Protein

Sequenzmotiv	Positionen in der GBV-C E2 Aminosäuresequenz	Aminosäure Muster in der GBV-C-E2 Referenzsequenz
N-Glykosylierungsstelle	229-232	<u>N</u> GSR
	244-247	<u>N</u> VTL
	402-405	<u>N</u> RTT
Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle	225-227	<u>S</u> CR
	337-339	<u>S</u> DR
	377-379	<u>S</u> VR
	408-410	<u>T</u> IR
	516-518	<u>S</u> GR
Caseinkinase II Phosphorylierungsstelle	314-317	<u>S</u> KVD
	337-340	<u>S</u> DRD
	341-344	<u>T</u> VVE
cAMP-&cGMP-Proteinkinase Phosphorylierungsstelle	495-498	RR <u>C</u> S

Übersicht der identifizierten Glykosylierungs und Phosphorylierungsstellen im GBV-C-E2 Protein. Gefunden wurden 3 mögliche N-Glykosylierungsstellen, 5 mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C, 1 für die cAMP&cGMP-Proteinkinase und 3 mögliche Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II. Die beiden rechten Spalten zeigen die Aminosäureposition der gefundenen Sequenzmotive und die Abfolge der Aminosäuren in der Sequenz des Referenzisolates U36380. Die Phosphorylierung und N-Glykosylierung finden an den unterstrichenen Aminosäuren statt.

230												
S	C	R	S	N	G	S	R	V	P	T	G	E
U36380-1
AB013500-1
gen1AB003291
GBV-C Genotyp1(119)	M	I	.	.	.
GBV-C Genotyp1(134)	I
GBV-C Genotyp1(146)
GBV-C Genotyp1(338)
GBV-C Genotyp1(252)
GBV-C Genotyp1(371)
gen2AF121950	.	.	A	I
gen2D90600	.	.	A	I
gen2AF031827	.	.	A	I
gen2U45966	.	.	A	Y	T	.	.	.
gen2AB003289	T	.	A
gen2AF104403	.	.	A
gen2U63715	.	.	A	I
gen2AF309966	.	.	A	X	I	X	.	.
gen2U44402	T	.	A	F	S	.	.	.
gen2AF081782	.	.	A	I
AY196904-2	T	.	K	A	.	.	.	I
GBV-C Genotyp2(007)	.	T	K
GBV-C Genotyp2(139)	.	.	A	I
GBV-C Genotyp2(151)	.	.	A	I
GBV-C Genotyp2(258)	.	.	A	I
GBV-C Genotyp2(308)	.	.	A	I
gen3D87713	.	.	E	A
gen3AF006500	.	.	A
gen3D87715	.	.	A	H	S	.	.	.
gen3D87712	.	.	K	H
gen3D87708	.	.	A	S	A	.	.	.
gen3AB008342	.	.	A
gen3AB003290	.	.	K	A
gen3D87711	.	.	A	H
gen3D87263	.	.	A
gen3D87714	.	.	A
gen3D87710	.	T	.	A
gen3AB003293	.	.	A
U94695-3	.	.	A
D87709-3	.	.	K
D90601-3	.	.	K
GBV-C Genotyp3(133)	.	.	A
GBV-C Genotyp3(371)	.	.	A
gen4AB018667	P	.	A
gen4AB003292	.	.	A
gen5AY949771-D50	.	.	K	A
GBV-C Genotyp5(131)	T	.	.	.
GBV-C Genotyp5(168)	S	I	.	.	.
GBV-C Genotyp5(193)
GBV-C Genotyp5(269)	T	.	A
AY951958-SA1-B155	.	.	A
AY951962-SA5-B175	.	.	A
AY951959-SA5-B157	.	.	A
AY951976-SA5-L120A	.	.	A	T	.	.	.
AY951967-SA5-B253	.	.	A
AY951957-SA5-B149	.	.	A
AY951965-SA5-B226	.	.	A
AY951964-SA5-B190	.	.	A
AY951968-SA5-B96	.	.	A
AY951977-SA5-L121A	.	.	A
AY951966-SA5-B243	.	.	A
AY951963-SA5-B183	P	.	A
AY951960-SA5-B161	.	.	A
AY951955-SA5-B124	.	.	A
AY951973-SA1-D62	P	T
AY951972-SA1-D51
AY951961-SA1-B172
AY951969-SA1-D21

Abbildung 4.20 Ausschnitt der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz. Durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben sind beispielhaft die N-Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition 229-232 (NGSR) und die Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle an der Aminosäureposition 225-227 (SCR). Die von uns sequenzierten Isolate sind mit einem roten Rahmen markiert. Die „leader“- Sequenz ist mit einem blauen Rahmen markiert. Der Genotyp der Referenzsequenzen ist durch einen Präfix *gen1-4, Suffix 1-3, SA1 für Genotyp 1* und *SA5* für GBV-C Genotyp 5 gekennzeichnet. Das Symbol X steht für eine nicht identifizierte Aminosäure. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt nach der Nummerierung der Nukleotide, beginnend mit dem Start-Methionin als Aminosäureposition Position 1. Das vollständige Alignment ist in Anhang V. auf der beigelegten CD zu finden.

Durch die vergleichende Analyse der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz konnten 6 distinkte, Genotyp-spezifische Sequenzpolymorphismen innerhalb des untersuchten 334 AS (1002BP) großen Abschnitts des GBV-C-E2 Proteins gefunden werden. Eine Hypervariable Region, vergleichbar mit der des HCV-E2 Proteins, konnte nicht identifiziert werden (siehe Tabelle 4.23).

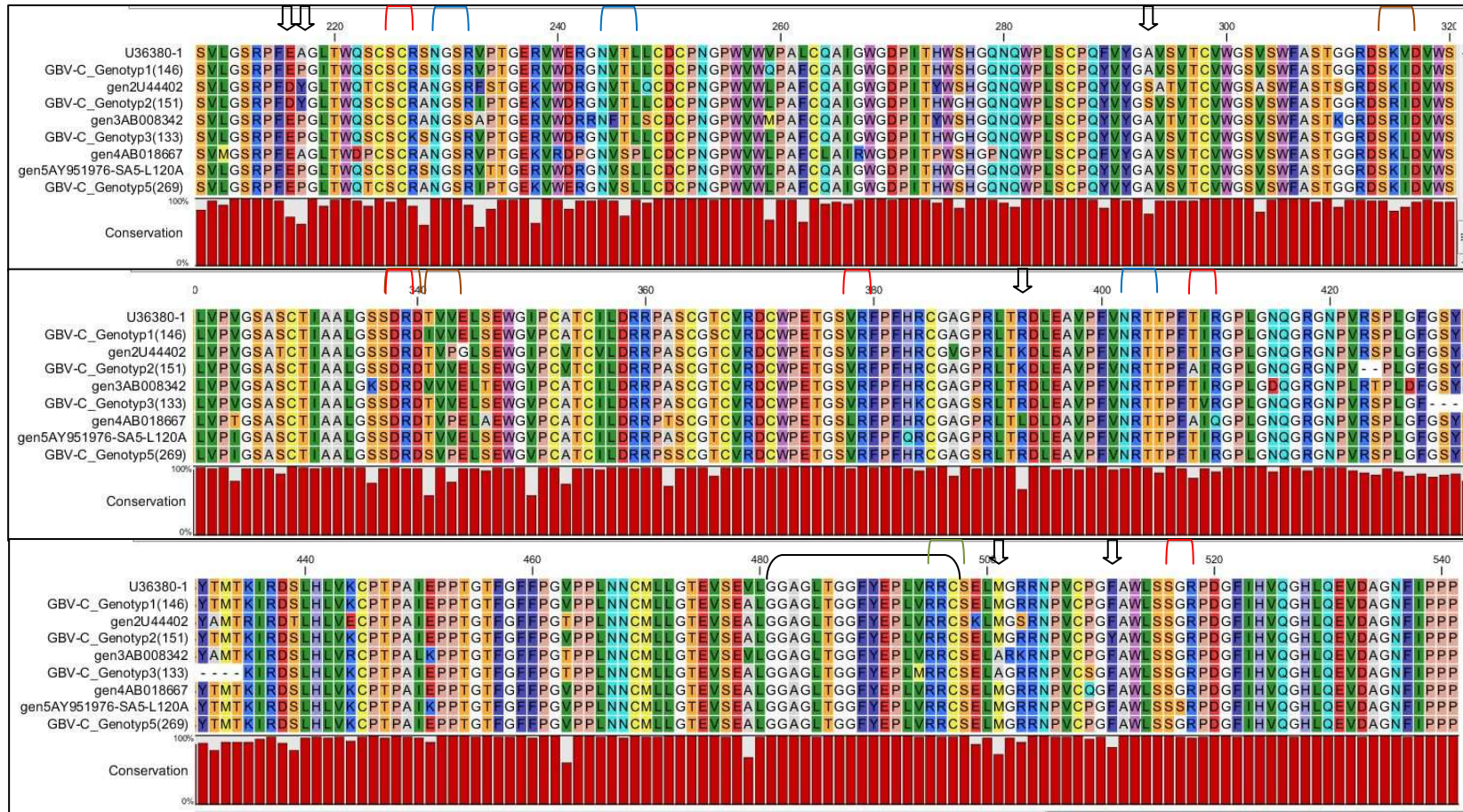
Tabelle 4.23: Genotyp-spezifische Sequenzpolymorphismen in der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz

Aminosäure-position	GBV-C Genotyp 1		GBV-C Genotyp 2		GBV-C Genotyp 3		GBV-C Genotyp 5
216	Glutaminsäure 100%		Asparaginsäure 100%		Glutamin -säure 88,2%	andere As. 11,8%	Glutaminsäure 100%
217	Prolin 57,1%	Alanin 42,9%	Tyrosin 87,5%	Arginin 12,5%	Prolin 88,2%	andere As. 11,8%	Prolin 100%
293	Alanin 100%		Serin 93,8%	Alanin 6,2%	Alanin 100%		Alanin 100%
393	Arginin 100%		Lysin 93,8%	Arginin 6,2%	Arginin 100%		Arginin 100%
501	Methionin 100%		Methionin 100%		Alanin 100%		Methionin 100%
511	Phenylalanin 100%		Tyrosin 68,8%	Phenyl- alanin (31,2%)	Phenylalanin 100%		Phenylalanin 100%

Genotyp-abhängige Sequenzpolymorphismen in der Aminosäuresequenz des GBV-C- E2 Proteins. Von den 6 Polymorphismen sind 3 nicht konservativ (orange unterlegt) und 3 konservativ (blau unterlegt).

In der Abbildung 4.21 ist eine schematische Darstellung der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz zu sehen, die einen kleinen Ausschnitt der vergleichenden Analyse der GBV-C-E2 Proteinsequenzen gibt. Die vollständigen Alignements der Aminosäuresequenz sind im Anhang V auf der beigelegten CD-ROM zu finden.

Abbildung 4.21: Alignment des untersuchten Aminosäuresequenzabschnitts von GBV-C-E2. Abgebildet sind beispielhaft die Aminosäuresequenzen von jeweils einer Referenzsequenz für Genotyp 1,2,3,4 und 5 und einer Probensequenz der Genotypen 1,2,3 und 5 (334 Aminosäuren). Die roten Balken gekennzeichnet den Grad der Konservierung in Prozent. Das GBV-C-E2 Protein ist über die gesamte von uns sequenzierte Länge hoch konserviert. Die schwarze Klammer kennzeichnet die vermutete Bindungsstelle, die roten Klammern die möglichen Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C, die blauen Klammern die möglichen N-Glykosylierungsstellen, die braunen Klammern die möglichen Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II und die die grüne Klammer die mögliche Phosphorylierungsstelle für die cAMP&cGMP-Proteinkinase. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Genotyp-spezifischen Polymorphismen



4.5.2 Vergleichende phylogenetische Analyse der GBV-C-E2 und 5'UTR Sequenz

Neben der 5'UTR-Region des GBV-C-Genoms kann auch die E2-Region zur Genotypisierung von GBV-C-Virus herangezogen werden (Smith et al. 2000). Ein Vergleich der phylogenetischen Analyse der GBV-C-E2 Region mit der Analyse der 5'UTR (siehe 4.1.3 und Anhang III.) zeigte bei den sequenzierten Isolaten eine vollkommene Übereinstimmung im Genotyp. Die phylogenetische Analyse der E2-Region bestätigte den Verdacht aus der phylogenetischen Analyse der 5'UTR, dass die Genotyp 5 Isolate aus Bonn ein so hohes Maß an Sequenz-Homologie aufweisen, dass sie sich in einem separaten Cluster innerhalb der Genotyp 5 Referenz Sequenzen eingruppierten lassen. Diese Gruppe von Isolaten könnte einen neuen Subtyp innerhalb des Genotyps 5 von GBV-C repräsentieren. Jedoch wurden auch bei Berücksichtigung der zusätzlichen Sequenzinformationen aus der E2-Region die zur Definition eines neuen Subtyps benötigten 70% beim Bootstrapping (100 Wiederholungen) nicht erreicht.

Die Abbildung 4.22 zeigt den phylogenetischen Baum zu der phylogenetischen Analyse der GBV-C-E2 Region:

5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation sollte die Bedeutung einer GBV-C-Koinfektion für wichtige klinische Parameter wie HIV-Viruslast, CD4⁺ T-Zellzahl, CD4⁺/CD8⁺ T-Zellratio, CDC-Stadien und opportunistische Infektionen untersucht werden, wobei der mögliche Einfluss von HAART, GBV-C-Viruslast, Genotyp und das Vorhandensein von GBV-C-E2 Antikörpern berücksichtigt werden sollten. Diese Beobachtungen sollten an einer großen Population HIV infizierter Patienten erhoben werden und durch molekulare Untersuchungen an einer zufällig ausgewählten Patientenstichprobe ergänzt werden, um mögliche molekulare und zelluläre Veränderungen durch eine GBV-C-Koinfektion zu identifizieren. Um eine möglichst große Diversität der verschiedenen GBV-C-Genotypen zu erreichen und die statistische Aussagekraft der Studie zu erhöhen, wurden die HIV-1 positiven Patienten über zwei europäische HIV-Ambulanzen für die Untersuchungen rekrutiert. Es gelang bei 564 Patienten der insgesamt 608 HIV-1 positiven Patienten vollständige klinische und virologische Daten zusammenzustellen. Eine vergleichende Analyse der 376 Patienten der HIV-Kohorte aus Bonn mit den 188 Patienten der HIV-Kohorte aus Barcelona zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Durchseuchung mit dem GB-Virus C, dem Vorhandensein von GBV-C-E2 Antikörpern, der durchschnittlichen HIV-Viruslast, der CD4⁺ T-Zellzahl, der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellratio oder dem Auftreten von opportunistischen Infektionen.

In Anbetracht dieser Übereinstimmungen konnten jedoch die beiden Kohorten aus Bonn, bzw. Barcelona zusammengefasst und als eine einheitliche Studienpopulation betrachtet werden.

5.1 Die HIV/GBV-C-Koinfektion

In der gepoolten Studienpopulation trat eine Koinfektion mit GBV-C bei 130 (23%) der untersuchten Patienten auf. Die Durchseuchungsrate liegt somit im unteren Bereich der bisher publizierten Studien, die eine Koinfektion mit GBV-C auf 14-50% der HIV infizierten Patienten bezifferten (Linnen et al. 1996; Feucht et al. 1997; Thomas et al. 1997b; Wachtler et al. 2000; Polgreen et al. 2003; Stapleton 2003; Stapleton et al. 2004). Eine Übersicht über die Infektionsraten (5-55%) in anderen Risikogruppen gibt die Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Infektionsraten von GBV-C in verschiedenen Risiko-Gruppen

Autor, Jahr, Land	Risiko-Gruppe	GBV-C-RNS (%)
(Masuko et al. 1996), Indonesien	Hämodialyse-Patienten	55
(Alter et al. 1997), USA	Hämodialyse-Patienten	20
(Karayiannis et al. 1997), England	Hämophilie-Patienten	14
	Immunglobulin-Gabe	5,4
	ivdu*	13,5
(Rubio et al. 1997), Deutschland	Hämodialyse-Patienten	5
	Nieren oder Leber-	14-20
	Transplantation	
(Lefrere et al. 2000), Frankreich	Hämodialyse-Patienten	57,5
(Martin et al. 1999), USA	Hämodialyse-Patienten	17,1
(Novikov et al. 2000), Russland	Hämophilie-Patienten	28
(Kumar et al. 2005), Indien	Hämodialyse-Patienten	6
(Kachko et al. 2005), Russland	ivdu	25
(Grabarczyk et al. 2006), Polen	Hämodialyse-Patienten	23,7

* intravenöser Drogenabusus

Die Prävalenz von nachweisbaren GBV-C-E2 Antikörpern lag mit 157 (27,8%) ebenfalls im unteren Bereich der bisher publizierten epidemiologischen Untersuchungen, die ein Auftreten von GBV-C-E2 Antikörpern bei durchschnittlich 47% der HIV infizierten Patienten beschreiben (Stapleton 2003). Obwohl im Allgemeinen die Ausbildung von GBV-C-E2 Antikörpern als Zeichen der Ausheilung einer GBV-C-Infektion gewertet wird (Thomas et al. 1998), lagen in dem Serum von 11 Patienten GBV-C-E2 Antikörper und eine GBV-C-Virämie gleichzeitig nebeneinander vor, ein Befund der in anderen HIV-Kohorten ebenfalls beobachtet werden konnte (Thomas et al. 1997a). Daher ist die Verwendung der GBV-C-E2 Antikörper als Marker einer ausgeheilten GBV-C-Infektion nur mit Vorbehalt zu akzeptieren (Tacke et al. 1997; Berzsényi et al. 2006), zumal das Ausheilen der GBV-C-Virämie nicht unbedingt mit der Ausbildung der E2-Antikörper einhergehen muss (Williams et al. 2004).

In Übereinstimmung mit anderen Studien war eine GBV-C-Koinfektion bei den homosexuellen Männern (57%) im Vergleich zu anderen HIV-Risikogruppen überrepräsentiert (Stark et al. 1999; Berzsényi et al. 2005a), was auf eine effektive, sexuelle Transmission bei homosexuellen Männern hinweist.

Es wird vermutet, dass die Ko-Evolution von GBV-C und die distinkte geographische Verteilung der GBV-C-Genotypen die prähistorische Migration der Menschheit mit Ursprung in Afrika widerspiegelt (Smith et al. 2000). Gestützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die afrikanischen GBV-C-Genotypen untereinander den höchsten Verwandtschaftsgrad aufweisen (Worobey et al. 2001). Die daraus resultierende geographische Verteilung der GBV-C-Genotypen macht es daher schwierig in regional begrenzten Kohorten eine ausreichende Anzahl verschiedener GBV-C-Genotypen für epidemiologische Analysen zu identifizieren.

Durch Einschluss von Patienten zweier HIV-Kohorten war es uns möglich zusätzlich zu dem in Europa vorherrschenden Genotyp 2 insgesamt 14 GBV-C Genotyp 1, 2 Genotyp 3 und 6 Genotyp 5 Isolate in unsere Analyse einzuschließen. Dennoch stellen diese Genotypen erwartungsgemäß eine Minderheit im Vergleich zu dem in Europa dominierenden GBV-C Genotyp 2 (n=105, 82,7%) dar. Die Herkunftsländer, der mit diesen Genotypen infizierten Patienten, reflektieren bis auf wenige Ausnahmen die vermutete geographische Verteilung der GBV-C-Genotypen. Lediglich die beiden Patienten, die mit dem in Asien hauptsächlich persistierenden GBV-C Genotyp 3 infiziert sind, stammen beide aus Europa. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich beide Patienten durch Kontakt zu Asiaten mit dem GB-Virus C infiziert haben.

Somit belegen unsere phylogenetischen Analysen das Auftreten von 4 der bisher 5 identifizierten 5 GBV-C-Genotypen in der Bonner Kohorte. In der Kohorte aus Barcelona dagegen konnten keine GBV-C-Isolate der Genotypen 3 und 5 identifiziert werden. Dies entspricht vermutlich dem geringen Anteil von Ausländern in dieser Kohorte.

Durch die vergleichende phylogenetische Analyse der 5'UTR und der GBV-C-E2 Region konnten zudem zwei Besonderheiten bezüglich der GBV-C Genotyp 5 Isolate in der Bonner Kohorte aufgedeckt werden. Zum einen wurden GBV-C Genotyp 5 Isolate bisher nur in Südafrika vermutet (Sathar et al. 2001; Muerhoff et al. 2005), während die 6 Bonner Patienten, die mit einem GBV-C Genotyp 5 Isolat koinfiziert waren, aus Kamerun (n=1), Äthiopien (n=1), Kenia (n=3) bzw. Ruanda (n=1) stammten und somit die Vermutung nahe legen, dass der Genotyp 5 geographisch weiter verbreitet ist, als bisher angenommen. Zum Anderen bilden die Genotyp 5 Isolate ein separates Cluster innerhalb der bekannten GBV-C-Referenzsequenzen, so dass ein neuer GBV-C Genotyp 5 Subtyp nicht ausgeschlossen werden kann. Der Bootstrap Wert beider phylogenetischen Analysen verfehlte mit 65% nur knapp den benötigten Wert von 70%.

5.2 Der positive Einfluss einer GBV-C-Koinfektion auf die Klinik von HIV

Ziel der hier vorliegenden Untersuchung war es, die widersprüchlich diskutierte Rolle des GBV-C für die Klinik der HIV-Infektion zu überprüfen. Deshalb galt unser Hauptinteresse der Frage, ob ein positiver Effekt von GBV-C in der Studienpopulation nachzuweisen ist. Bei der Analyse zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der GBV-C-Viruslast und der CD4⁺ T-Zellzahl/ μ l ($p=0,004$) und ein ebenso signifikanter inverser Zusammenhang zwischen GBV-C-Viruslast und HIV-Viruslast ($p=0,004$). Ähnliche Korrelationen konnten auch in vorherigen Studien zumindest teilweise beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Toyoda zeigte, dass GBV-C koinfizierte Patienten eine geringere mittlere Viruslast hatten, als HIV monoinfizierte Patienten (Toyoda et al. 1998). Eine erhöhte CD4⁺ T-Zellzahl bei GBV-C-koinfizierten Patienten gegenüber HIV monoinfizierten Patienten wurde auch in den Studien von Heringlake, Yeo und Schwarze-Zander beobachtet (Heringlake et al. 1998; Yeo et al. 2000; Schwarze-Zander et al. 2006). Eine invers signifikante Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast und eine signifikante Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der CD4⁺ T-Zellzahl wurde von der Arbeitsgruppe um Handelsman beobachtet. In einer aktuellen Arbeit von Maidana-Giret et al. wurden die gleichen Korrelationen beobachtet, die durch die wahrscheinlich zu geringe Anzahl an Probanden ($n=48$) keine statistische Signifikanz erreichte (Handelsman et al. 2007; Maidana-Giret et al. 2009).

Die positiven Effekte einer GBV-C-Virämie auf die HIV-Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl blieben auch dann bestehen, wenn die Patienten mit HAART isoliert betrachtet wurden. Ein Befund, der auf einen starken Einfluss der GBV-C-Koinfektion auf die HIV-Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl auch vor dem Hintergrund der antiviralen Wirksamkeit von HAART hinweist.

Die Persistenz des GBV-C-Effektes unter HAART wurde in vorangegangenen Arbeiten kontrovers diskutiert:

Studien sowohl aus der Prä-HAART-Ära (Heringlake et al. 1998; Toyoda et al. 1998; Yeo et al. 2000; Xiang et al. 2001) als auch unter HAART (Nunnari et al. 2003; Tillmann et al. 2004; Williams et al. 2004; Schwarze-Zander et al. 2006; Tillmann et al. 2006; Zhang et al. 2006; Maidana-Giret et al. 2009) weisen für GBV-C-positive Patienten auf eine langsamere Krankheitsprogression, weniger Todesfälle, einen geringeren Verlust von CD4⁺ T-Zellen, einen geringeren Anstieg der HIV-Viruslast und/oder eine bessere Lebensqualität hin.

Andere Studien zeigten dagegen keinen Effekt einer GBV-C-Virämie auf den Verlauf der HIV-Infektion unter HAART (Birk et al. 2002; Bjorkman et al. 2004; Kaye et al. 2005; Bjorkman et al. 2007).

Eine Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse könnten die relativ kleinen Kohorten liefern, die in den bisherigen Arbeiten untersucht wurden. So wurden in der Studie von Birk et al. insgesamt 157 HIV-1 positive Patienten untersucht, 37 davon mit GBV-C-Koinfektion, in der Studie von Björkman et al. waren es 230 HIV-1 positive Patienten, 62 davon mit einer GBV-C-Koinfektion und in der Studie von Kaye et al. wurden 250 HIV-1/HIV-2 positive Patienten untersucht, 48 hiervon mit einer GBV-C-Koinfektion.

Diskrepante Ergebnisse aufgrund zu geringer Fallzahl konnten wir ebenfalls beobachten, wenn wir die Kohorte aus Barcelona getrennt von der Kohorte aus Bonn analysierten. In der Kohorte aus Barcelona konnte keine signifikante inverse Korrelation der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast gefunden werden (188 Patienten, davon 40 GBV-C koinfiziert), während in der Kohorte aus Bonn bei 376 Patienten (101 GBV-C koinfiziert) die signifikante inverse Korrelation mit $p=0,004$ deutlich hervortrat, die so auch in der Gesamtkohorte zu finden war.

Des Weiteren wurde in den Studien von Birk und Bjorkman lediglich der GBV-C-Status, nicht aber die GBV-C-Viruslast ermittelt, womit der mögliche Einfluss unterschiedlich hoher Viruslasten in diesen Kohorten nicht berücksichtigt wurde.

In unserer Studienpopulation war es möglich einen Genotyp-abhängigen Effekt auf die absolute $CD4^+$ T-Zellzahl feststellen. Patienten, die mit einem GBV-C Genotyp 1 Isolat koinfiziert waren, hatten gegenüber mit GBV-C Genotyp 2 koinfizierten Patienten signifikant niedrigere $CD4^+$ T-Zellzahlen/ μl ($p=0,003$). Schwarze-Zander et al. kamen in einer Studie US-amerikanischen Studie 2006 zu vergleichbaren Ergebnissen. Die absolute $CD4^+$ T-Zellzahl GBV-C 1 koinfizierter Patienten war auch hier signifikant gegenüber GBV-C Genotyp 2 koinfizierten Patienten erniedrigt. Auswirkungen einer GBV-C-Koinfektion auf die CDC-Stadien und das Auftreten von opportunistischen Infektionen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Hier scheint die HAART mögliche positive Effekte des GBV-C-Virus zu maskieren.

Eine besondere Stellung unter den GBV-C koinfizierten Patienten nahmen die Patienten ein, bei denen neben der GBV-C-RNS auch GBV-C-E2 Antikörper nachgewiesen werden konnten. Wenn auch durch die kleine Anzahl von 11 Patienten nicht statistisch signifikant, so hebt sich die Gruppe der gleichzeitig für GBV-C-RNS und GBV-C-E2 Antikörper positiv

getesteten HIV-Patienten von den anderen Gruppen ab. Vor allem die sehr geringe durchschnittliche HIV-Viruslast (2.985 Kopien/ml) scheint ein Hinweis auf eine zusätzliche protektive Wirkung der GBV-C-E2 Antikörper zu sein, zumal auch von der Arbeitsgruppe um Xiang berichtet wurde, dass Antikörper gegen das GBV-C-E2 Protein die Infizierbarkeit von PBMCs durch HIV verringern (Xiang et al. 2006).

5.3 Welche Pathomechanismen liegen der Korrelation von GBV-C-Viruslast mit HIV-Viruslast und CD4⁺ T-Zellzahl zu Grunde?

Eine grundlegende Frage seitdem ein möglicher günstiger Einfluss der GBV-C-Koinfektion auf den Verlauf der HIV-Infektion vermutet wird, betrifft die möglichen molekularen und zellulären Mechanismen, die die beobachteten Effekte erklären könnten. Anfänglich war das Fehlen pathophysiologisch begründeter Hypothesen eines der größten Probleme für die Verfechter der Hypothese, dass GBV-C einen günstigen Einfluss auf den Verlauf einer HIV-Infektion hat. Inzwischen wird eine Vielzahl von unterschiedlichen, möglichen Pathomechanismen zur HIV-GBV-C-Interaktion diskutiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, einige der zuvor an Hand relativ kleiner Patientenkollektive postulierten Mechanismen zur Wirkung von GBV-C auf die HIV-Viruslast und die CD4⁺ T-Zellzahl mittels der großen Studienkohorte zu überprüfen und durch die Beachtung weiterer Faktoren, wie GBV-C-Viruslast, GBV-C-E2 Antikörper und GBV-C-Genotyp zu ergänzen. Die daher ins Auge gefassten Mechanismen sind in Abbildung 5.1 zusammengefasst.

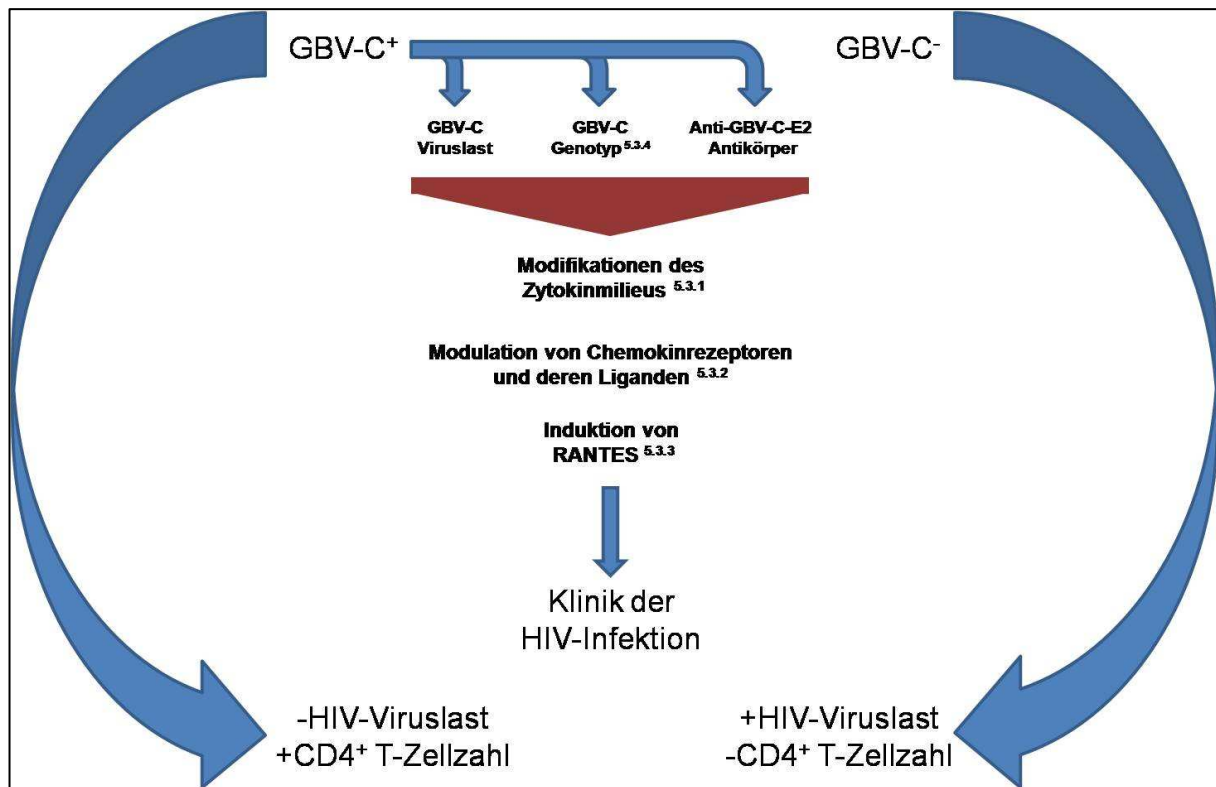


Abbildung 5.1: Übersicht über die postulierten Hypothesen zur Wirkung der GBV-C-Koinfektion über eine veränderte CCR5 und CXCR4 Oberflächenexpression, veränderte Bildung der Liganden (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) und die Modulation des Zytokinmilieus.

5.3.1 Modifikationen des Zytokinmilieus

In der 105 Patienten umfassenden, repräsentativen Stichprobe der gesamten Studienpopulation konnte ein deutlicher Einfluss der GBV-C-Koinfektion auf die Zytokine IFN- γ (interferon gamma) und IP-10 (interferon inducible protein 10) beobachtet werden.

Während die HIV monoinfizierten Patienten gegenüber den gesunden Probanden einen signifikant erhöhten IFN- γ Serumspiegel aufweisen, war der IFN- γ Serumspiegel der GBV-C koinfizierten Patienten von diesem Referenzkollektiv nicht verschieden.

IFN- γ wird in der Literatur als pleiotropes Zytokin beschrieben. Einerseits hat IFN- γ eine antivirale Potenz (Emilie et al. 1992; Creery et al. 2004; Sindhu et al. 2006; Zhang 2007), andererseits kann es die virale Replikation von HIV stimulieren. So konnte in einer Arbeit um die Gruppe von Zaitseva gezeigt werden, dass IFN- γ einen inhibitorischen Effekt auf die Infektion von MDM- Zellen (**monocyte derived macrophages**) durch M-trope HIV-1 Stämme hat, während die Virusinfektion von T-tropen Stämmen gesteigert wurde (Zaitseva et al. 2000).

Kannanganat et al. fanden eine signifikante Korrelation zwischen IFN- γ und HIV-Viruslast, wenn die untersuchte CD4⁺ T-Zell-Subpopulation IFN- γ als einziges Zytokin produzierten. Jedoch beobachtete diese Gruppe eine signifikant inverse Korrelation, wenn die untersuchte Subpopulation neben IFN- γ weitere Zytokine wie IL-2 und TNF- α sezernierte (Kannanganat et al. 2007).

Die Arbeitsgruppe um Fuchs et al. beschrieb erhöhte IFN- γ Serumspiegel bei HIV infizierten Patienten (Fuchs et al. 1989) und in der Arbeit von Lore K et al. konnte gezeigt werden, dass auch dendritische Zellen IFN- γ produzieren, wenn sie mit HIV-1 Isolaten infiziert werden (Lore et al. 1999). Ebenso beobachtet wurde, dass bei Patienten mit einem SNP (single-nucleotide polymorphism) im IFN- γ Promoter und einer damit verbundenden Allel-spezifisch erhöhten IFN- γ Produktion einen beschleunigten CD4⁺ T-Zellverlust nach HIV-Infektion aufwiesen (An et al. 2003).

Tatsächlich konnten wir in unserer Stichprobe einen direkten Effekt der IFN- γ Serumspiegel auf die HIV-Viruslast feststellen. Patienten, deren IFN- γ Serumspiegel auf dem Niveau der gesunden Probanden lag, hatten signifikant niedrige HIV-Viruslasten. Diese Patienten waren in der GBV-C koinfizierten Subgruppe signifikant häufiger vertreten (85,7%) als in der HIV monoinfizierten Subgruppe (22,9%) bzw. der HIV⁺/GBV-C-E2 Antikörper positiven Subgruppe (23,1%). Somit könnte eine geringere IFN- γ Produktion bei GBV-C-koinfizierten Patienten zu einer Verringerung der HIV-Viruslast und damit zu einem günstigeren Verlauf der HIV-Infektion führen.

Das proinflammatorische Zytokin IFN- γ aktiviert CD4⁺ T-Zellen über den Jak/STAT1 Signalweg. Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B wird IRF-1 (interferon regulatory factor-1) hochreguliert (Fujita et al. 1989; Abdollahi et al. 1991; Harada et al. 1994; Schroder et al. 2004), was dann wahrscheinlich die HIV-Replikation begünstigt (Fauci 1996). IRF-1 und sein funktioneller Antagonist IRF-2 sind die am vollständigsten charakterisierten Mitglieder der IRF-Familie. Sie sind an der Regulation von Genen während entzündlicher Prozesse, bei der Immunantwort, Hämatopoese, Zellproliferation und Differenzierung beteiligt (Nguyen et al. 1997; Taniguchi et al. 2001). HIV-1 induziert die IRF-1 Expression bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion (vor der Bildung des Tat-Proteins). Diese Stimulation der IRF-1 Produktion korreliert mit einer erhöhten IRF-1 Bindungsaktivität der spezifischen Zielsequenz im LTR (long terminal repeat) von HIV-1 und erleichtert die Transkriptionsaktivierung (el Kharroubi et al. 1996; Sgarbanti et al. 2002).

Eine durch IRF-1 aktivierte Transkription von Tat führt dann ihrerseits zur Verstärkung der LTR-gesteuerten Genexpression von HIV-Proteinen und letztendlich zu einer höheren Viruslast. Zusätzlich zu dem Effekt von IRF-1 auf die LTR Transkriptionsaktivierung bei der *de novo* Infektion mit HIV scheint diesem Transkriptionsfaktor auch eine Rolle bei der HIV-Reaktivierung aus der Latenz des Virus zuzukommen. Dieser Vorgang kann nur in aktivierten T-Zellen stattfinden und IRF-1 wird nur in diesen, aktiven T-Zellen, exprimiert (Nelson et al. 1996). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass eine intrazelluläre Erhöhung der IRF-1 Spiegel zu einer von Tat unabhängigen Reaktivierung von HIV-1 beiträgt.

Somit könnte die Suppression der IFN- γ Produktion bzw. Freisetzung durch GBV-C zu einer Verringerung der HIV-Viruslast und damit zu einer Verbesserung der Prognose von HIV infizierten Patienten führen und das obwohl die die IFN vermittelte angeborene Immunantwort normalerweise einen wirkungsvollen Mechanismus gegen virale Infektion darstellt.

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um das IFN-System zu beeinflussen und dessen antivirale Wirkung zu inhibieren oder abzuschwächen. Zum Beispiel kodiert der ORF von HHV-8 (**H**umanes **H**erpes **V**irus-**8**) für vier IRF homologe Proteine, die IRF-1 durch einen dominant negativen Effekt blockieren, während die Proteine E6 (**e**nvelope **6**) und E7 (**e**nvelope **7**) des Papillomavirus direkt an IRF3 und IRF1 binden und damit einerseits die IRF3 Aktivierung und andererseits die Aktivierung des IFN- β Promotors durch IRF-1 blockieren. Das Hepatitis C Virus, ein enger Verwandter des GBV-C-Virus, blockiert durch Bindung der viralen Proteine NS5A bzw. HCV-E2 an die RNS-abhängige Proteinkinase (PKR) dessen Funktion. Ferner inhibiert das Virusprotein NS3 durch seine Funktion als Protease die Bildung von IRF-3 Homodimeren und nachfolgend die Aktivierung des IFN- β Promotors (Ploegh 1998; Levy et al. 2001; Lorenzo et al. 2001; Flint et al. 2004).

In Analogie zu diesen Befunden bei Typ I Interferonen, könnte die Suppression von IFN- γ durch GBV-C einen viralen „Schutz“-Mechanismus darstellen, durch den GBV-C eine Aktivierung von IRF-1 blockiert. Als Folge würde auch die IRF-1 vermittelte Transkriptionsaktivierung der HIV-LTR inhibiert, und darüber eine Reaktivierung der HIV-Replikation verhindert werden.

Erwartungsgemäß waren die Serumspiegel von IP-10 (**i**nterferon- γ **i**nducible **p**rotein **10**) bei den Patienten erhöht, die einen erhöhten IFN- γ Serumspiegel aufweisen, da IP-10 durch IFN- γ über den JAK/STAT-Signalweg induziert werden kann (Dhillon et al. 2007).

IP-10 ist ein Ligand von CXCR3. Er wurde als „early response“-Gen nach Induktion durch IFN- γ in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Endothelzellen, Keratozyten und Fibroblasten bezeichnet (Luster et al. 1985; Luster et al. 1987b; a; Loetscher et al. 1996).

Stylianou und Kollegen beobachteten erhöhte IP-10 Serumspiegel bei HIV-1 infizierten Patienten, und erhöhte IP-10 Plasmaspiegel korrelierten dabei mit Therapieversagen unter HAART (Stylianou et al. 2000). Die eigenen Daten bestätigen diesen Zusammenhang. IP-10 scheint in der Lage zu sein, die Replikation von HIV-1 in MDM-Zellen und PBMCs zu stimulieren. In Blockierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch Neutralisierung von endogenem IP-10 oder Gabe von CXCR3 Antagonisten eine HIV-1 Replikation in Makrophagen und Lymphozyten gehemmt werden konnte (Lane et al. 2003). IP-10 kann aktivierte T-Zellen und Monozyten als Chemokin zu HIV-1 infizierten MDM-Zellen und dendritischen Zellen leiten; dadurch können diese dann selbst leichter infiziert werden (Luster et al. 1993; Taub et al. 1993; Taub et al. 1996). Auf der anderen Seite scheint IP-10 auch eine Rolle bei der Apoptose zu spielen: Huifang et al. konnten zeigen, dass IP-10 in der Lage ist, in HeLa-Zellen Apoptose zu induzieren (Zhang et al. 2005). Sui und Kollegen demonstrierten, dass IP-10 die Permeabilität der Zellmembranen von neuronalen Zellen in Kultur erhöht und den programmierten Zelltod induziert (Sui et al. 2004). Die mögliche klinische Relevanz dieser Studie wird durch Beobachtungen gestärkt, dass in Sektionen von HIV-1 infizierten Gehirnen neben erhöhten Caspase3-Spiegel in den Neuronen auch erhöhte IP-10 Spiegel gemessen wurden.

Für die HIV/GBV-C koinfizierten Patienten wurde aufgrund der niedrigen IFN- γ Serumspiegel ebenso niedrige IP-10 Serumspiegel erwartet, aber im Gegensatz zu IFN- γ waren die Serumspiegel der HIV/GBV-C koinfizierten Patienten gegenüber den gesunden Probanden genauso stark erhöht wie bei den HIV monoinfizierten Patienten und den HIV/GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten.

Dieser unerwartete Befund lässt sich zumindest teilweise über unterschiedliche Wirkungen der einzelnen GBV-C-Genotypen auf die IP-10 Serumspiegel erklären. Während Patienten, die mit dem Genotyp 1 Isolat infiziert waren, hohe IP-10 Serumspiegel aufwiesen, waren die Serumspiegel von HIV/GBV-C Genotyp 2 koinfizierten Patienten signifikant niedriger als bei HIV monoinfizierten Patienten, und der Serumspiegel der HIV/GBV-C Genotyp 5 koinfizierten Patienten lag auf dem Niveau gesunder Probanden.

Nimmt man die GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten aus der Analyse heraus, ist der IP-10 Serumspiegel der verbliebenden HIV/GBV-C koinfizierten Patienten signifikant niedriger als die der HIV monoinfizierten ($p=0,05$) und der HIV/GBV-C-E2 Antikörper positiven Patienten ($p=0,023$).

In diesem Zusammenhang wird möglicherweise auch die signifikant niedrigere $CD4^+$ T-Zellzahl der GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten gegenüber den anderen Patienten mit HIV-Infektion verständlich, da hohe IP-10 Spiegel zu einer erhöhten Apoptose von $CD4^+$ T-Zellen führen können.

Ein weiterer wichtiger Zusammenhang zwischen IP-10 Expression und HIV/GBV-C-Koinfektion wird durch Arbeiten von Valerie et al. und Wetzel et al. nahegelegt, die eine von $IFN-\gamma$ und STAT1 unabhängige, direkt durch das HIV-1 gp120-Protein vermittelte, Induktion von IP-10 in Astrozyten (Asensio et al. 2001) und auch PBMCs (Wetzel et al. 2002) beobachteten. Damit wäre es durchaus denkbar, dass auch GBV-C über einen ähnlichen Mechanismus die Serumspiegel von IP-10 unabhängig von $IFN-\gamma$ modifiziert und dass aufgrund Genotyp-spezifischer Unterschiede GBV-C Genotyp 1 Isolate in der Lage sind, eine Produktion von IP-10 effektiver zu stimulieren als GBV-C Genotyp 2 Isolate.

Zusammengefasst könnte die Verminderung der $IFN-\gamma$ Serumspiegel bei allen Patienten mit GBV-C-Virämie eine Erklärung für die beobachteten niedrigen HIV-Viruslasten liefern, während hohe IP-10 Serumspiegel bei den GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten für die signifikant niedrigeren $CD4^+$ T-Zellzahlen bei den mit GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten verantwortlich sein könnten.

5.3.2 Modulation von Chemokinrezeptoren und deren Liganden

Ein weiterer Mechanismus, über den eine GBV-C-Infektion eine positive Wirkung auf HIV infizierte Patienten ausüben könnte, wurde erstmals von Nattermann et al. beobachtet und ist in den folgenden Jahren von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt worden:

Hiernach kommt es zu einer verminderten Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 bei den HIV/GBV-C koinfizierten Patienten auf $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen. Ein möglicher Mechanismus hierfür ist eine über das GBV-C-E2- bzw. das NS5a- Protein vermittelte Freisetzung von RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β bzw. SDF-1 aus T-Lymphozyten mit nachfolgender Internalisierung von CCR5 und CXCR4 (Nattermann et al. 2003; Xiang et al. 2004; Jung et al. 2005; Jung et al. 2007).

Deshalb wurde die CCR5 und CXCR4 Oberflächenexpression in einer Stichprobe von 145 HIV infizierten Patienten bestimmt, für die vollständige klinische und virologische Daten erhoben werden konnten.

Da die CCR5-Δ32 Mutation zu einer verminderten Oberflächenexpression von CCR5 führt, wurden alle heterozygoten Träger dieser Mutation aus unserer Stichprobe ausgeschlossen. Die CCR5-Oberflächenexpression war bei diesen Patienten auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen aufgrund der veränderten CCR5-Genexpression signifikant erniedrigt. In Übereinstimmung mit Tillmann et al. konnte jedoch keine Assoziation zwischen der GBV-C-Infektion und der CCR5 Δ32 Mutation festgestellt werden (Tillmann et al. 2002).

Unsere Analysen zeigten eine höhere Oberflächenexpression von CCR5 auf CD4⁺ T-Zellen bei HIV monoinfizierten Patienten mit fortgeschrittenem Immundefekt (CD4⁺ T-Zellzahl < 200 Zellen/μl) im Vergleich zu den HIV/GBV-C koinfizierten Patienten. Nicht signifikant unterschiedlich war dagegen der prozentuelle Anteil der CCR5 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen zwischen HIV monoinfizierten Patienten und HIV/GBV-C koinfizierten Patienten. Zusammengenommen lassen diese beiden Befunde auf eine erhöhte Dichte von CCR5-Rezeptormolekülen auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen bei HIV monoinfizierten Patienten mit einer CD4⁺ T-Zellzahl unter 200 Zellen/μl schließen. Dieser Effekt konnte sowohl bei Patienten ohne HAART, als auch bei Patienten mit HAART gezeigt werden. Eine ähnliche Hochregulierung der CCR5-Korezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen beschrieben Reynes und Kollegen, die beobachteten, dass während einer fortschreitenden HIV-Infektion erhöhte CCR5-Rezeptordichten auf CD4⁺ T-Zellen mit einem Verlust von CD4⁺ T-Zellen einhergehen (Reynes et al. 2001). Interessanterweise konnte eine Hochregulierung der CCR5-Oberflächenrezeptoren bei den HIV/GBV-C koinfizierten Patienten mit niedrigen CD4⁺ T-Zellzahlen (< 200 Zellen/μl) nicht gefunden werden. Geringere CCR5-Oberflächenexpression auf CD4⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger GBV-C-Infektion konnte zuvor von mehreren Gruppen beobachtet werden (Nattermann et al. 2003, Xiang et al. 2004, Maidana-Giret et al. 2009).

Im Unterschied zu CCR5 konnte für CXCR4 kein signifikanter Effekt von HIV auf die Expression auf CD4⁺ T-Zellen gefunden werden. Bei GBV-C koinfizierten Patienten wurde jedoch eine verminderte Oberflächenexpression von CXCR4 auf CD4⁺ T-Zellen bei fortgeschrittenem Immundefekt beobachtet. Dieser Effekt war bei Aufteilung nach HAART auch für die Patienten ohne HAART zu beobachten. Diese Beobachtung kann möglicherweise auch für die Pathogenese der GBV-C-Koinfektion von Bedeutung sein.

Xiang und Kollegen konnten zeigen, dass durch Expression von GBV-C-NS5A in Jurkat Zellen die HIV-1 Replikation in diesen Zellen reduziert wird, indem die CXCR4-Rezeptordichte abnimmt. In diesen Untersuchungen war dieser Effekt aber nur partiell durch eine Freisetzung von SDF-1, dem natürlichen Ligand von CXCR4, erklärbar. Daher wird daneben eine direkte Wirkung des GBV-C-Virus auf die Oberflächenexpression von CXCR4 vermutet (Xiang et al. 2006). Zusammengefasst manifestierten sich Effekte der GBV-C-Koinfektion auf die CCR5 und CXCR4 Oberflächenexpression nur bei Patienten mit fortgeschrittenem CD4⁺-T-Zellverlust. Diese Beobachtung korreliert mit den epidemiologischen Daten. Dass sich ein positiver Einfluss der GBV-C-Koinfektion auf den Verlauf der HIV-Infektion erst spät im Krankheitsverlauf bemerkbar macht, wurde auch schon von Williams und Kollegen vermutet. Sie wiesen darauf hin, dass eine signifikante Assoziation von GBV-C mit verminderter Mortalität nur für die späten Stadien der HIV-Infektion belegt werden konnte (Williams et al. 2004). Ihre Vermutung wurde durch zwei weiteren Studien an HIV infizierten Patienten ohne fortgeschrittenen Immundefekt gestärkt, die keine positive Wirkung einer GBV-C-Koinfektion auf den frühen Verlauf der HIV-Infektion nachweisen konnten (Birk et al. 2002; Bisson et al. 2005).

Die Mechanismen über die GBV-C eine veränderte Expression von CCR5 und CXCR4 verursacht, müssen weiter untersucht werden.

5.3.3 Induktion von RANTES

Die RANTES-Spiegel, einem wichtigen Liganden des CCR5-Rezeptors, sind im Blut nicht zuverlässig bestimmbar, da RANTES aus Thrombozyten während der Serum oder Plasma-Gewinnung freigesetzt werden kann. Deshalb etablierten wir einen *in vitro* Assay, um zu überprüfen, ob GBV-C-Partikel in der Lage sind, eine RANTES-Induktion zu stimulieren. Wir fanden eine vom GBV-C-Genotyp abhängige Induktion von RANTES, wenn PBMCs gesunder Probanden mit immobilisierten GBV-C-Partikeln und/oder rekombinantem GBV-C-E2 Protein stimuliert wurden. RANTES führt als Ligand des HIV-Korezeptors CCR5 zu dessen Internalisierung. Damit könnte eine Induktion von RANTES einen möglichen Mechanismus darstellen, über den GBV-C die Infizierbarkeit von CD4⁺ T-Zellen durch HIV herabsenkt.

Analysen immortalisierter T-Zellklone, die aus HIV infizierten Patienten mit verschiedenen klinischen Stadien gewonnen wurden zeigten, dass CD4⁺ T-Zellen von „non-progressors“ hohe Spiegel von RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β sekretierten und sich gegenüber einer Infektion durch C5-trope HIV-Virenstämme resistent zeigten, während CD4⁺ T-Zellen von AIDS-Patienten nur geringe Mengen dieser CC-Chemokine bildeten und für eine Infektion mit HIV suszeptibel waren (Saha et al. 1998). Nattermann et al. wiesen 2003 eine Bindung des GBV-C-E2 Proteins an CD81 nach und zeigten, dass daraus eine erhöhte RANTES Produktion folgt, die *in vitro* die Oberflächenexpression von CCR5 reduziert (Nattermann et al. 2003). Die durch das GBV-C-E2 Protein vermittelte RANTES Sekretion konnte *in vitro* von Xiang und Kollegen bestätigt werden (Xiang et al. 2005), während eine neuere Arbeit eine spezifische Interaktion des GBV-C-E2 Proteins mit CD81 nicht nachweisen konnte, aber eine Bindung des GBV-C-E2 Proteins an Zellen (Kaufman et al. 2007). Der Mechanismus über den GBV-C PBMCs zu einer vermehrten Freisetzung von RANTES bringt, bleibt weiter zu untersuchen. Diskutiert werden Mechanismen, die über das E2 Protein bzw. die NS2/NS3 Proteine des GBV-C-Virus vermittelt werden (Xiang et al. 2004, Jung et al. 2005). Die Beobachtung, dass neben gebundenen GBV-C-Viruspartikeln auch immobilisiertes, rekombinantes GBV-C-E2 in der Lage war RANTES zu induzieren, stärkt die Vermutung, dass zumindest ein Teil des Effekts auf die RANTES Sekretion über das GBV-C-E2 Protein vermittelt wird. In diesem Zusammenhang ist es möglicherweise von Bedeutung, dass wir eine niedrigere Induktion von RANTES bei Genotyp 1 beobachteten, die mit unseren Befunden bezüglich erniedrigter CD4⁺ T-Zellzahlen und den erhöhten IP-10 Spiegel bei GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten übereinstimmte. Damit könnte es sein, dass Unterschiede in den biologischen Effekten von GBV-C Genotyp 1 Isolaten auf einer verminderten Fähigkeit RANTES zu induzieren beruhen.

5.3.4 Das GBV-C-E2 Protein, Ursprung der Genotyp-abhängigen Effekte?

Für RNS Viren, wie GBV-C und seinen nächsten Verwandten HCV, sind unterschiedliche biologische Eigenschaften in Abhängigkeit vom Genotyp beschrieben worden. Diese Zusammenhänge sind bei HCV bisher besser untersucht. Obwohl sich der strukturelle Aufbau des Genoms für die unterschiedlichen HCV-Genotypen ähnelt, ist der HCV-Genotyp ein wichtiger Faktor für das Ansprechen auf die Interferon-Therapie.

So werden neben der schlechten Prognose hinsichtlich der antiviralen Therapieresponse von HCV-Genotyp 1 gegenüber HCV Genotyp 2 und 3 infizierten Patienten (Berg et al. 1995; Pawlotsky 2003; Hnatyszyn 2005) auch Unterschiede in der Pathogenese, unter anderem der Grad der Fibrose und die Bildung einer Fettleber (*Steatosis hepatis*) von verschiedenen HCV-Genotypen vermutet (Rubbia-Brandt et al. 2000; Adinolfi et al. 2001). Ein Einfluss der verschiedenen HIV-Genotypen auf Viruslast, perinatale Transmissionsraten, virale Promotoraktivität, Symptom-freie Überlebenszeit und Resistenz gegenüber antiviralen Medikamenten wurde für HIV beschrieben (Montano et al. 1997; Essex 1999; Kanki et al. 1999; Renjifo et al. 2001). Schließlich werden biologische Unterschiede zwischen den GBV-C-Genotypen auch für die Wirkung auf den Krankheitsverlauf von HIV diskutiert (Muerhoff et al. 2003; Berzsenyi et al. 2005b).

Erste Studien konnten tatsächlich Hinweise finden, die für eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber einer Interferon-Therapie und für Unterschiede im Zell-Tropismus einzelner GBV-C-Genotypen sprechen (Kato et al. 1998; Shimizu et al. 1999; Fogeda et al. 2000; Xiang et al. 2000). Weiterhin bestehen Genotyp-spezifische Unterschiede in der Fähigkeit von GBV-C Isolaten *in vitro* in PBMCs zu persistieren, die auf variable Sequenzmotive in regulatorischen Untereinheiten des GBV-C-Virus zu beruhen scheinen, die das Wachstum von GBV-C in Zellkulturen beeinflussen können (George et al. 2003).

In dieser Dissertation wurden neue Genotyp-abhängige Effekte auf die CD4⁺ T-Zellzahl, die IP-10 Serumspiegel und die RANTES-Induktion gefunden. Hierbei konnte bei Patienten mit einer GBV-C Genotyp 1 Koinfektion eine signifikant niedrigere CD4⁺ T-Zellzahlen und signifikant erhöhte IP-10 Serumspiegel beobachtet werden. Zudem war der GBV-C Genotyp 1 in unseren *in vitro*-Experimenten nicht in der Lage RANTES effektiv zu induzieren. Zusammen mit der Beobachtung, dass immobilisiertes rekombinantes GBV-C-E2 Protein in der Lage ist, RANTES zu stimulieren, haben wir zunächst vermutet, dass diese funktionellen Unterschiede zwischen den Genotypen auf Variationen in der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz zurückgeführt werden können. Diese wurde deshalb molekularbiologisch analysiert und nach den häufigsten GBV-C-Genotypen aufgeschlüsselt.

Die GBV-C-E2 Aminosäuresequenz war jedoch über weite Strecken hoch konserviert. Weder in der „immunodominant antigenic site“ noch in den bekannten Glykosilierungs- oder Phosphorylierungs-Motiven konnten Genotyp-spezifische Polymorphismen identifiziert werden.

Nur zwei der Isolate wiesen in diesem Abschnitt Aminosäureaustausche auf: Insgesamt unterscheiden sich die beiden GBV-C Genotypen 1 und 5 lediglich an einer Stelle voneinander, was aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrads der beiden Genotypen erklärbar ist (Smith et al. 2000). Die GBV-C-E2 Sequenz der Genotyp 2 Isolate unterscheidet sich von diesen Genotypen mit Ursprung in Afrika an insgesamt 5 Aminosäurepositionen. Aber keiner der Polymorphismen korrelierte mit einem der bekannten Glykosilierungs- oder Phosphorylierungs-Motiven oder der vermuteten Bindungsstelle an CD81. Aus den vorhandenen Daten lässt sich daher weitgehend ausschließen, dass Genotyp-abhängige funktionelle Unterschiede auf Aminosäureunterschiede in der GBV-C-E2 Sequenz zurückzuführen sind. Leider konnte in dieser Arbeit nicht die ganze Sequenz des E2-Proteins untersucht werden. Daher ist es nicht möglich, wenn auch wenig wahrscheinlich, dass in dem nicht untersuchten Genabschnitt Unterschiede bestehen, die das unterschiedliche biologische Verhalten der einzelnen Genotypen erklären könnten. Die weitere Aufklärung zwischen strukturellen Merkmalen der GBV-C-Proteine und differentiellen Effekten auf die HIV-Infektion muss daher nachfolgenden Untersuchungen vorenthalten bleiben.

5.4 Zusammenfassung

Die Auswirkungen einer Koinfektion auf den Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion werden bis heute kontrovers diskutiert. Ebenso sind die Mechanismen, mit dem GBV-C den Progress einer HIV-Infektion beeinflussen kann bisher nicht vollständig verstanden.

Um zu klären, welchen Einfluss eine GBV-C-Koinfektion auf den Verlauf einer HIV-Infektion ausübt, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine 564 Patienten umfassende Studienpopulation aus zwei europäischen HIV-1 Kohorten untersucht. Hierzu wurde in einer eingehenden epidemiologischen Analyse überprüft, ob eine Koinfektion mit GBV-C einen Effekt auf verschiedene klinische, immunologische und virologische Parameter wie CDC-Stadien, opportunistische Infektionen, CD4⁺ T-Zellzahl und HIV-Viruslast ausübt. Um ein möglichst vollständiges Bild über mögliche Wechselwirkungen einer HIV/GBV-C-Koinfektion zu erhalten, wurden die verschiedenen Genotypen von GBV-C, die GBV-C-Viruslast und das Vorhandensein der GBV-C-E2-Antikörper mit berücksichtigt.

Da die Progression einer HIV-Erkrankung unter anderem von dem Zytokinmilieu des betreffenden Patienten abhängt, wurde die Auswirkung einer GBV-C-Koinfektion auf die Serumspiegel von IL-12, IP-10 und IFN- γ mittels ELISA überprüft.

Ebenso kann die Expression der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 und deren Liganden MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, einen Einfluss auf verschiedene Parameter einer HIV-Infektion ausüben, da eine Herunterregulation von CCR5 bzw. CXCR4 zu einer verringerten Infizierbarkeit der CD4- bzw. CD8-positiven Zellen führen kann. Die extrazelluläre Expression der HIV-Korezeptoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt, während die Expression der Liganden MIP-1 α , MIP 1 β mittels ELISA analysiert wurde.

Weiterhin wurde die Induzierbarkeit von RANTES durch GBV-C-Viruspartikel mittels eines von uns entwickelten Stimulations-Assay untersucht.

Die eingehende epidemiologische Analyse zeigte bei den 130 GBV-C koinfizierten Patienten einen von HAART unabhängigen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der GBV-C-Viruslast mit der CD4⁺ T-Zellzahl/ μ l und ein ebenso deutlich signifikant inversen Zusammenhang zwischen der GBV-C-Viruslast mit der HIV-Viruslast. Analysen in Bezug auf eine mögliche Abhängigkeit biologischer Effekte vom GBV-C-Genotyp zeigten, dass Patienten, die mit einem GBV-C Genotyp 1 Isolat koinfiziert waren, gegenüber allen anderen HIV bzw. HIV/GBV-C Genotyp 2 koinfizierten Patienten eine signifikant erniedrigte CD4⁺ T-Zellzahl aufwiesen.

Bei der Analyse der Zytokin-Serumspiegel wurden unabhängig von HAART signifikant niedrigere IFN- γ Serumspiegel bei GBV-C koinfizierten Patienten im Vergleich zu HIV monoinfizierten Patienten beobachtet. Interessanterweise korrelierten die von uns beobachteten niedrigen IFN- γ Serumspiegel mit niedrigeren HIV-Viruslasten. Zusätzlich konnten signifikant erhöhte IP-10 Serumspiegel bei GBV-C Genotyp 1 koinfizierten Patienten festgestellt werden, die möglicherweise über einen noch näher zu klärenden Mechanismus Apoptose von CD4⁺ T-Zellen auslösen könnte.

Wir konnten beobachten, dass der HIV-Korezeptor CXCR4 auf CD4⁺ T-Zellen in HIV/GBV-C koinfizierten Patienten unabhängig von einer HAART im Vergleich zu HIV monoinfizierten Patienten mit fortgeschrittener Immundefizienz herabgesenkt war, während bei HIV monoinfizierten Patienten mit fortgeschrittenem Immundefekt die CCR5 Oberflächenexpression erhöht war.

Schließlich konnten wir in unserer *in vitro* Analyse zeigen, dass GBV-C in der Lage ist RANTES, ein Ligand des CCR5 Korezeptors, Genotyp-spezifisch zu induzieren. Hierbei war auffällig, dass GBV-C Genotyp 1 Isolate nicht in der Lage waren, RANTES zu induzieren. Diese Befunde sprechen für einen eher negativen Einfluss einer GBV-C Genotyp 1 Koinfektion.

Die Hypothese, dass die Genotyp-abhängigen Effekte auf Sequenzunterschiede in der GBV-C-E2 Region zurückzuführen sind, konnte nicht bestätigt werden.

Aus unseren Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass eine GBV-C Infektion einen positiven, von der GBV-C-Viruslast und dem GBV-C-Genotyp abhängigen, Einfluss auf die Klinik von HIV ausübt und dass dieser Einfluss zumindest teilweise durch Pathomechanismen erklärbar ist, die auf das Zytokinmilieu von IFN- γ und IP-10, die Genotyp abhängige Induzierbarkeit von RANTES, sowie auf die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR4 wirken.

6 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., K. A. Lord, et al. (1991). "Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition." Cell Growth Differ **2**(8): 401-407.
- Adinolfi, L. E., M. Gambardella, et al. (2001). "Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity." Hepatology **33**(6): 1358-1364.
- Alkhatib, G., C. C. Broder, et al. (1996a). "Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages." J Virol **70**(8): 5487-5494.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996b). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Alter, H. J. (1996). "The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C." N Engl J Med **334**(23): 1536-1537.
- Alter, H. J., Y. Nakatsuji, et al. (1997). "The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease." N Engl J Med **336**(11): 747-754.
- An, P., D. Vlahov, et al. (2003). "A tumor necrosis factor-alpha-inducible promoter variant of interferon-gamma accelerates CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus-1-infected individuals." J Infect Dis **188**(2): 228-231.
- Asensio, V. C., J. Maier, et al. (2001). "Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro." J Virol **75**(15): 7067-7077.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature **392**(6676): 565-568.
- Bellin, T., M. Pulz, et al. (2001). "Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes." J Clin Microbiol **39**(1): 370-374.
- Benkirane, M., D. Y. Jin, et al. (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." J Biol Chem **272**(49): 30603-30606.
- Berg, T., V. Konig, et al. (1995). "[Prognostic relevance of hepatitis C virus genotype for responsiveness to interferon-alpha]." Z Gastroenterol **33**(8): 426-430.
- Berzsenyi, M. D., D. S. Bowden, et al. (2005a). "Male to male sex is associated with a high prevalence of exposure to GB virus C." J Clin Virol **33**(3): 243-246.
- Berzsenyi, M. D., D. S. Bowden, et al. (2005b). "GB virus C: insights into co-infection." J Clin Virol **33**(4): 257-266.

-
- Berzsenyi, M. D. and S. K. Roberts (2006). "What is the role of GB virus C infection in hepatitis C virus/HIV coinfection?" *J Infect Dis* **194**(4): 407-409.
- Birk, M., S. Lindback, et al. (2002). "No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients." *AIDS* **16**(18): 2482-2485.
- Bisson, G. P., B. L. Strom, et al. (2005). "Effect of GB virus C viremia on HIV acquisition and HIV set-point." *AIDS* **19**(16): 1910-1912.
- Bjorkman, P., L. Flamholz, et al. (2007). "Enhanced and resumed GB virus C replication in HIV-1-infected individuals receiving HAART." *AIDS* **21**(12): 1641-1643.
- Bjorkman, P., L. Flamholz, et al. (2004). "GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality." *AIDS* **18**(6): 877-886.
- Blanpain, C., I. Migeotte, et al. (1999). "CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist." *Blood* **94**(6): 1899-1905.
- Bleul, C. C., L. Wu, et al. (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925-1930.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* **18**(7): 1723-1729.
- Bourlet, T., C. Guglielminotti, et al. (1999). "Prevalence of GBV-C/hepatitis G virus RNA and E2 antibody among subjects infected with human immunodeficiency virus type 1 after parenteral or sexual exposure." *J Med Virol* **58**(4): 373-377.
- Boyum, A. (1968). "Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**: 7.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* **12**(12): 1365-1371.
- Brust, D., Jagannatha, S., Herpin, B. et al. 2002 "HGV infection does not prolong survival of patients with early stage HIV disease: importance of HIV viral load as a predictor of mortality." *Abstracts of the 14th international AIDS Conference, Barcelona, Spain, July 7-12*.
- Burger, J. A., M. Burger, et al. (1999). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells." *Blood* **94**(11): 3658-3667.
- Chang, Q., J. H. McLinden, et al. (2007). "Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line." *J Gen Virol* **88**(Pt 12): 3341-3346.

-
- Clapham, P. R. and A. McKnight (2001). "HIV-1 receptors and cell tropism." Br Med Bull **58**: 43-59.
- Clerici, M., J. V. Giorgi, et al. (1992). "Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1." J Infect Dis **165**(6): 1012-1019.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-1815.
- Cohen, M. C. and S. Cohen (1996). "Cytokine function: a study in biologic diversity." Am J Clin Pathol **105**(5): 589-598.
- Copeland, K. F. (2006). "Inhibition of HIV-1 entry into cells." Recent Patents Anti-Infect Drug Disc **1**(1): 107-112.
- Creery, D., W. Weiss, et al. (2004). "Down-regulation of CXCR-4 and CCR-5 expression by interferon-gamma is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency virus (HIV) replication but not HIV entry into human monocytes." Clin Exp Immunol **137**(1): 156-165.
- Crotta, S., A. Stilla, et al. (2002). "Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein." J Exp Med **195**(1): 35-41.
- Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." EMBO J **16**(23): 6996-7007.
- Dalgleish, A. G. (1985). "Human retroviruses." Aust N Z J Med **15**(3): 375-385.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-666.
- Dhillon, N. K., F. Peng, et al. (2007). "PDGF synergistically enhances IFN-gamma-induced expression of CXCL10 in blood-derived macrophages: implications for HIV dementia." J Immunol **179**(5): 2722-2730.
- Doms, R. W. (2000). "Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection." Virology **276**(2): 229-237.
- Dragic, T. (2001). "An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function." J Gen Virol **82**(Pt 8): 1807-1814.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-673.
- el Kharroubi, A. and M. A. Martin (1996). "cis-acting sequences located downstream of the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure and transcriptional activity." Mol Cell Biol **16**(6): 2958-2966.

-
- Emilie, D., M. C. Maillot, et al. (1992). "Antagonistic effect of interferon-gamma on tat-induced transactivation of HIV long terminal repeat." J Biol Chem **267**(29): 20565-20570.
- Engvall, E., K. Jonsson, et al. (1971a). "Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes." Biochim Biophys Acta **251**(3): 427-434.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971b). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.
- Erlich, H. A., D. Gelfand, et al. (1991). "Recent advances in the polymerase chain reaction." Science **252**(5013): 1643-1651.
- Essex, M. (1999). "Human immunodeficiency viruses in the developing world." Adv Virus Res **53**: 71-88.
- Fauci, A. S. (1996). "Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease." Nature **384**(6609): 529-534.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-877.
- Feucht, H. H., B. Zollner, et al. (1997). "Distribution of hepatitis G viremia and antibody response to recombinant proteins with special regard to risk factors in 709 patients." Hepatology **26**(2): 491-494.
- Flint, M., C. Logvinoff, et al. (2004). "Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins." J Virol **78**(13): 6875-6882.
- Fogeda, M., J. M. Lopez-Alcorocho, et al. (2000). "Existence of distinct GB virus C/hepatitis G virus variants with different tropism." J Virol **74**(17): 7936-7942.
- Foley, J. F., C. R. Yu, et al. (2005). "Roles for CXC chemokine ligands 10 and 11 in recruiting CD4+ T cells to HIV-1-infected monocyte-derived macrophages, dendritic cells, and lymph nodes." J Immunol **174**(8): 4892-4900.
- Fuchs, D., G. Reibnegger, et al. (1989). "Cytokines and acquired immunodeficiency syndrome." Am J Med **86**(4): 509.
- Fujita, T., L. F. Reis, et al. (1989). "Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9936-9940.
- George, S. L., J. Xiang, et al. (2003). "Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures." Virology **316**(2): 191-201.
- Grabarczyk, P., E. Brojer, et al. (2006). "[GBV-C/HGV and TTV infection markers in Polish blood donors and haemophilia patients]." Przegl Epidemiol **60**(3): 581-588.

-
- Handelsman, E., I. Cheng, et al. (2007). "Impact of GB virus type C infection on mother-to-child HIV transmission in the Women and Infants Transmission Study Cohort." HIV Med **8**(8): 561-567.
- Harada, H., E. Takahashi, et al. (1994). "Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system." Mol Cell Biol **14**(2): 1500-1509.
- Hassoba, H. M., N. A. Terrault, et al. (1997). "Antibody to GBV-C second envelope glycoprotein (anti-GBV-C E2): is it a marker for immunity?" J Med Virol **53**(4): 354-360.
- Heringlake, S., J. Ockenga, et al. (1998). "GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients?" J Infect Dis **177**(6): 1723-1726.
- Higgins, D. G., A. J. Bleasby, et al. (1992). "CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment." Comput Appl Biosci **8**(2): 189-191.
- Hnatyszyn, H. J. (2005). "Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes." Antivir Ther **10**(1): 1-11.
- Horuk, R. (1999). "Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields." Immunol Today **20**(2): 89-94.
- Horuk, R. (2001). "Chemokine receptors." Cytokine Growth Factor Rev **12**(4): 313-335.
- Izmailova, E., F. M. Bertley, et al. (2003). "HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages." Nat Med **9**(2): 191-197.
- Jasin, M., K. A. Page, et al. (1991). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored CD4/Thy-1 chimeric molecules serve as human immunodeficiency virus receptors in human, but not mouse, cells and are modulated by gangliosides." J Virol **65**(1): 440-444.
- Jung, S., M. Eichenmuller, et al. (2007). "HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C." AIDS **21**(5): 645-647.
- Jung, S., O. Knauer, et al. (2005). "Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors." AIDS **19**(12): 1267-1272.
- Kachko, A. V., A. E. Ershov, et al. (2005). "[The occurrence rate of HGV/GBV-C RNA and risk factors in patients of narcological dispensary in Novosibirsk]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(2): 25-30.
- Kanki, P. J., D. J. Hamel, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression." J Infect Dis **179**(1): 68-73.

-
- Kannanganat, S., B. G. Kapogiannis, et al. (2007). "Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines." J Virol **81**(21): 12071-12076.
- Karayiannis, P., J. Pickering, et al. (1997). "Hepatitis G virus infection." Lancet **349**(9056): 954.
- Kato, T., M. Mizokami, et al. (1998). "Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus." J Med Virol **55**(2): 109-117.
- Kaufman, T. M., J. H. McLinden, et al. (2007). "The GBV-C envelope glycoprotein E2 does not interact specifically with CD81." AIDS **21**(8): 1045-1048.
- Kaye, S., M. Howard, et al. (2005). "No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2." Clin Infect Dis **40**(6): 876-878.
- Kopetzki, E., A. Jekle, et al. (2008). "Closing two doors of viral entry: intramolecular combination of a coreceptor- and fusion inhibitor of HIV-1." Virology **5**: 56.
- Kumar, D., A. Arora, et al. (2005). "Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients from urban Delhi." Ren Fail **27**(1): 87-93.
- Lalle, E., A. Sacchi, et al. (2008). "Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection." Int J Immunopathol Pharmacol **21**(1): 161-171.
- Lane, B. R., S. R. King, et al. (2003). "The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication." Virology **307**(1): 122-134.
- Leary, T. P., A. S. Muerhoff, et al. (1996). "Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis." J Med Virol **48**(1): 60-67.
- Lee, C., Q. H. Liu, et al. (2003). "Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways." J Leukoc Biol **74**(5): 676-682.
- Lefrere, J. J., F. Roudot-Thoraval, et al. (1999). "Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons." J Infect Dis **179**(4): 783-789.
- Lefrere, J. J., A. Sender, et al. (2000). "High rate of GB virus type C/HGV transmission from mother to infant: possible implications for the prevalence of infection in blood donors." Transfusion **40**(5): 602-607.
- Levy, D. E. and A. Garcia-Sastre (2001). "The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion." Cytokine Growth Factor Rev **12**(2-3): 143-156.

-
- Lichterfeld, M., L. Leifeld, et al. (2002). "Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection." J Infect Dis **185**(12): 1803-1807.
- Linnen, J., J. Wages, Jr., et al. (1996). "Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent." Science **271**(5248): 505-508.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-377.
- Loetscher, M., B. Gerber, et al. (1996). "Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes." J Exp Med **184**(3): 963-969.
- Lore, K., A. Sonnerborg, et al. (1999). "HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation." AIDS **13**(15): 2013-2021.
- Lorenzo, M. E., H. L. Ploegh, et al. (2001). "Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology." Semin Immunol **13**(1): 1-9.
- Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." J Exp Med **178**(3): 1057-1065.
- Luster, A. D. and J. V. Ravetch (1987a). "Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)." J Exp Med **166**(4): 1084-1097.
- Luster, A. D. and J. V. Ravetch (1987b). "Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site." Mol Cell Biol **7**(10): 3723-3731.
- Luster, A. D., J. C. Unkeless, et al. (1985). "Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins." Nature **315**(6021): 672-676.
- Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
- Maecker, H. T. (2003). "Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation." BMC Immunol **4**: 1.
- Maecker, H. T. and S. Levy (1997). "Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice." J Exp Med **185**(8): 1505-1510.
- Maidana-Giret, M. T., T. M. Silva, et al. (2009). "GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load." AIDS **23**(17): 2277-2287.
- Martin, P., F. Fabrizi, et al. (1999). "Epidemiology and natural history of hepatitis G virus infection in chronic hemodialysis patients." Am J Nephrol **19**(5): 535-540.

-
- Masuko, K., T. Mitsui, et al. (1996). "Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis." N Engl J Med **334**(23): 1485-1490.
- McLinden, J. H., T. M. Kaufman, et al. (2006). "Characterization of an immunodominant antigenic site on GB virus C glycoprotein E2 that is involved in cell binding." J Virol **80**(24): 12131-12140.
- Menten, P., A. Wuyts, et al. (2002). "Macrophage inflammatory protein-1." Cytokine Growth Factor Rev **13**(6): 455-481.
- Menten, P., A. Wuyts, et al. (2004). "Purification, identification, and synthesis of chemokines." Methods Mol Biol **249**: 47-64.
- Moaven, L. D., C. A. Hyland, et al. (1996). "Prevalence of hepatitis G virus in Queensland blood donors." Med J Aust **165**(7): 369-371.
- Montano, M. A., V. A. Novitsky, et al. (1997). "Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes." J Virol **71**(11): 8657-8665.
- Morrison, H. and H. Harmon (2000). "'Hot spots' associated with the photoinduced binding of cis-dichloro bis(1,10 phenanthroline)rhodium(III) chloride to HIV-1 and c-raf DNA." Photochem Photobiol **72**(6): 731-738.
- Muerhoff, A. S., T. P. Leary, et al. (2005). "African origin of GB virus C determined by phylogenetic analysis of a complete genotype 5 genome from South Africa." J Gen Virol **86**(Pt 6): 1729-1735.
- Muerhoff, A. S., J. N. Simons, et al. (1996). "Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes." J Hepatol **25**(3): 379-384.
- Muerhoff, A. S., H. L. Tillmann, et al. (2003). "GB virus C genotype determination in GB virus-C/HIV co-infected individuals." J Med Virol **70**(1): 141-149.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**(Pt 1): 263-273.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Murakami, T. and N. Yamamoto (2000). "Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection." Int J Hematol **72**(4): 412-417.
- Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." Immunol Rev **177**: 175-184.
- Nagasawa, T., T. Nakajima, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14726-14729.

-
- Nansen, A., J. P. Christensen, et al. (2002). "The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity." Blood **99**(4): 1237-1245.
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, et al. (2004). "Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5." J Viral Hepat **11**(6): 519-526.
- Nattermann, J., H. D. Nischalke, et al. (2003). "Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection." AIDS **17**(10): 1457-1462.
- Nelson, N., Y. Kanno, et al. (1996). "Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation." J Immunol **156**(10): 3711-3720.
- Nguyen, H., R. Lin, et al. (1997). "Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF-1 or IRF/RelA fusion proteins." Oncogene **15**(12): 1425-1435.
- Nischalke, H. D., J. Nattermann, et al. (2004). "Rapid determination of the Delta32 deletion in the human CC-chemokine receptor 5 (CCR5) gene without DNA extraction by lightcycler real-time polymerase chain reaction." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(7): 750-754.
- Nischalke HD, Nattermann J, Kupfer B, Rockstroh J, Sauerbruch T, Spengler U. „Ein neues Verfahren zum raschen quantitativen Nachweis von Hepatitis G Virus RNA mittels one-step realtime RT-PCR.“ *19. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, GASL 2003, Z Gastroenterol. 2003, Band XLI, Abstract P3614*
- Novikov, D. V., V. K. Pimenov, et al. (2000). "[Determination of hepatitis G virus markers in various risk groups]." Vopr Virusol **45**(6): 20-22.
- Nunnari, G., L. Nigro, et al. (2003). "Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile." Ann Intern Med **139**(1): 26-30.
- Okamoto, H., H. Nakao, et al. (1997). "The entire nucleotide sequences of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan." J Gen Virol **78** (Pt 4): 737-745.
- Pawlotsky, J. M. (2003). "Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C." Antiviral Res **59**(1): 1-11.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-941.
- Ploegh, H. L. (1998). "Viral strategies of immune evasion." Science **280**(5361): 248-253.
- Polgreen, P. M., J. Xiang, et al. (2003). "GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals." Microbes Infect **5**(13): 1255-1261.

-
- Premack, B. A. and T. J. Schall (1996). "Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection." Nat Med **2**(11): 1174-1178.
- Qin, S., J. B. Rottman, et al. (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." J Clin Invest **101**(4): 746-754.
- Quiros-Roldan, E., M. C. Maroto, et al. (2002). "No evidence of beneficial effect of GB virus type C infection on the course of HIV infection." AIDS **16**(10): 1430-1431.
- Rambusch, E. G., H. Wedemeyer, et al. (1998). "[Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C--a review of the literature]." Z Gastroenterol **36**(1): 41-53.
- Raport, C. J., J. Gosling, et al. (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-17166.
- Renjifo, B., W. Fawzi, et al. (2001). "Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes." J Hum Virol **4**(1): 16-25.
- Reynes, J., P. Portales, et al. (2001). "CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression." AIDS **15**(13): 1627-1634.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, et al. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem **245**(2): 154-160.
- Rubbia-Brandt, L., R. Quadri, et al. (2000). "Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3." J Hepatol **33**(1): 106-115.
- Rubio, A., C. Rey, et al. (1997). "Is hepatitis G virus transmitted sexually?" JAMA **277**(7): 532-533.
- Saha, K., G. Bentsman, et al. (1998). "Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro." J Virol **72**(1): 876-881.
- Sallusto, F. and M. Baggiolini (2008). "Chemokines and leukocyte traffic." Nat Immunol **9**(9): 949-952.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-725.
- Sathar, M. A. and D. F. York (2001). "Group 5: GBV-C/HGV isolates from South Africa." J Med Virol **65**(1): 121-122.
- Schleicher, S. B. and B. F. Flehmig (2003). "Genotyping of GB virus C by restriction pattern analysis of the 5' untranslated region." J Med Virol **71**(2): 226-232.

-
- Schmidtmayerova, H., H. S. Nottet, et al. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 700-704.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.
- Schwarze-Zander, C., J. T. Blackard, et al. (2006). "GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfected patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype." J Infect Dis **194**(4): 410-419.
- Sgarbanti, M., A. Borsetti, et al. (2002). "Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors." J Exp Med **195**(10): 1359-1370.
- Shimizu, Y. K., M. Hijikata, et al. (1999). "Replication of GB virus C (hepatitis G virus) in interferon-resistant Daudi cells." J Virol **73**(10): 8411-8414.
- Siebert, P. D. and J. W. Larrick (1992). "Competitive PCR." Nature **359**(6395): 557-558.
- Simons, J. N., S. M. Desai, et al. (1996). "Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization." J Virol **70**(9): 6126-6135.
- Simons, J. N., T. P. Leary, et al. (1995). "Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis." Nat Med **1**(6): 564-569.
- Sindhu, S., E. Toma, et al. (2006). "Relationship of in vivo and ex vivo levels of TH1 and TH2 cytokines with viremia in HAART patients with and without opportunistic infections." J Med Virol **78**(4): 431-439.
- Smith, D. B., M. Basaras, et al. (2000). "Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus." J Gen Virol **81**(Pt 3): 769-780.
- Smith, D. B., N. Cuceanu, et al. (1997). "Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5' non-coding region." J Gen Virol **78** (Pt 7): 1533-1542.
- Stapleton, J. T. (2003). "GB virus type C/Hepatitis G virus." Semin Liver Dis **23**(2): 137-148.
- Stapleton, J. T. and K. Chaloner (2004). "GB virus C and survival in HIV-positive people." AIDS **18**(17): 2343-2344; author reply 2345-2346.
- Stark, K., C. D. Doering, et al. (1999). "Risk and clearance of GB virus C/hepatitis G virus infection in homosexual men: A longitudinal study." J Med Virol **59**(3): 303-306.
- Stylianou, E., P. Aukrust, et al. (2000). "Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection." Clin Exp Immunol **119**(3): 479-485.

-
- Sui, Y., R. Potula, et al. (2004). "Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis." Am J Pathol **164**(5): 1557-1566.
- Tacke, M., K. Kiyosawa, et al. (1997). "Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein." Lancet **349**(9048): 318-320.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-655.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, et al. (1993). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." J Exp Med **177**(6): 1809-1814.
- Taub, D. D., D. L. Longo, et al. (1996). "Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice." Blood **87**(4): 1423-1431.
- Tersmette, M., J. J. van Dongen, et al. (1989). "Human immunodeficiency virus infection studied in CD4-expressing human-murine T-cell hybrids." Virology **168**(2): 267-273.
- Thomas, D. L., Y. Nakatsuji, et al. (1997a). "Persistence and clinical significance of hepatitis G virus infections in injecting drug users." J Infect Dis **176**(3): 586-592.
- Thomas, D. L., D. Vlahov, et al. (1998). "Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection." J Infect Dis **177**(3): 539-542.
- Thomas, H. C., J. Pickering, et al. (1997b). "Identification, prevalence and aspects of molecular biology of hepatitis G virus." J Viral Hepat **4 Suppl 1**: 51-54.
- Tillmann, H. L., H. Heiken, et al. (2001a). "Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients." N Engl J Med **345**(10): 715-724.
- Tillmann, H. L., T. Kaiser, et al. (2006). "Differential influence of different hepatitis viruses on quality of life in HIV positive patients." Eur J Med Res **11**(9): 381-385.
- Tillmann, H. L. and M. P. Manns (2001b). "GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus." Antiviral Res **52**(2): 83-90.
- Tillmann, H. L., M. P. Manns, et al. (2004). "GB virus C infection and quality of life in HIV-positive patients." AIDS Care **16**(6): 736-743.
- Tillmann, H. L., M. Stoll, et al. (2002). "Chemokine receptor polymorphisms and GB virus C status in HIV-positive patients." AIDS **16**(5): 808-809.
- Toyoda, H., Y. Fukuda, et al. (1998). "Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **17**(3): 209-213.

-
- Tseng, C. T. and G. R. Klimpel (2002). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions." J Exp Med **195**(1): 43-49.
- Van der Bij, A. K., N. Kloosterboer, et al. (2005). "GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study." J Infect Dis **191**(5): 678-685.
- Viola, A., B. Molon, et al. (2008). "Chemokines: coded messages for T-cell missions." Front Biosci **13**: 6341-6353.
- Wachtler, M., A. Hofmann, et al. (2000). "Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and anti-E2 glycoprotein antibodies in homosexual men with HIV coinfection." Infection **28**(5): 297-300.
- Wack, A., E. Soldaini, et al. (2001). "Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells." Eur J Immunol **31**(1): 166-175.
- Wang, A. M., M. V. Doyle, et al. (1989). "Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9717-9721.
- Weber, J. (1989). "The biology and epidemiology of HIV infections." J Antimicrob Chemother **23 Suppl A**: 1-7.
- Wetzel, M. A., A. D. Steele, et al. (2002). "The effect of X4 and R5 HIV-1 on C, C-C, and C-X-C chemokines during the early stages of infection in human PBMCs." Virology **292**(1): 6-15.
- Williams, C. F., D. Klinzman, et al. (2004). "Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men." N Engl J Med **350**(10): 981-990.
- Worobey, M. and E. C. Holmes (2001). "Homologous recombination in GB virus C/hepatitis G virus." Mol Biol Evol **18**(2): 254-261.
- Xiang, J., S. L. George, et al. (2004). "Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1." Lancet **363**(9426): 2040-2046.
- Xiang, J., D. Klinzman, et al. (1998). "Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein." J Virol **72**(4): 2738-2744.
- Xiang, J., J. H. McLinden, et al. (2008). "Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication." PLoS ONE **3**(7): e2580.
- Xiang, J., J. H. McLinden, et al. (2006). "An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15570-15575.
- Xiang, J., M. A. Sathar, et al. (2005). "South African GB virus C isolates: interactions between genotypes 1 and 5 isolates and HIV." J Infect Dis **192**(12): 2147-2151.

-
- Xiang, J., S. Wunschmann, et al. (2001). "Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection." N Engl J Med **345**(10): 707-714.
- Xiang, J., S. Wunschmann, et al. (2000). "Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells." J Virol **74**(19): 9125-9133.
- Xiang J, Mc Linden J, Chang Q et al. „Monoclonal antibodies directed against the GB Virus C major envelope glycoprotein neutralize HIV infectivity differentially in PBMC than in TZB-bl cells.“ *13th CROI 2006, Denver*
<http://www.retroconference.org/2006/PDFs/417.pdf>
- Xiao, X., A. Kinter, et al. (2000). "Interactions of CCR5 and CXCR4 with CD4 and gp120 in human blood monocyte-derived dendritic cells." Exp Mol Pathol **68**(3): 133-138.
- Yeo, A. E., A. Matsumoto, et al. (2000). "Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study." Ann Intern Med **132**(12): 959-963.
- Yolken, R. H., H. W. Kim, et al. (1977). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis." Lancet **2**(8032): 263-267.
- Zaitseva, M., S. Lee, et al. (2000). "Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility of macrophages to human immunodeficiency virus type 1 infection." Blood **96**(9): 3109-3117.
- Zampino, R., J. Pickering, et al. (1999). "Hepatitis G virus/GBV-C persistence: absence of hypervariable E2 region and genetic analysis of viral quasispecies in serum and lymphocytes." J Viral Hepat **6**(3): 209-218.
- Zhang, H. M., J. Yuan, et al. (2005). "Gamma interferon-inducible protein 10 induces HeLa cell apoptosis through a p53-dependent pathway initiated by suppression of human papillomavirus type 18 E6 and E7 expression." Mol Cell Biol **25**(14): 6247-6258.
- Zhang, J. (2007). "Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease." J Clin Invest **117**(4): 871-873.
- Zhang, W., K. Chaloner, et al. (2006). "Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis." HIV Med **7**(3): 173-180.
- Zhuang, J., A. E. Jetzt, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots." J Virol **76**(22): 11273-11282.

7 Anhang

I. Zytokine und ihre Rezeptoren

Zytokine und ihre Rezeptoren			
Familie	Zytokine (systematischer Name)	Zytokine (alternativer Name)	Spezifische(r) Rezeptor(en)
Kolonie-stimulierende Faktoren	G-CSF		G-CSFR
	GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor	CD116,βc
	M-CSF	CSF-1	CSF-1R
Interferone	IFN-α		CD118, IFNAR2
	IFN-β		CD118, IFNAR2
	IFN-γ		CD119, IFNGR2
Interleukine	IL-1α		CD121a, CD121b
	IL-1β		CD121a, CD121b
	IL-1 RA		CD121a
	IL-2	T-cell growth factor	CD25α, CD122β, CD132
	IL-3	multicolony CSF	CD 123, βc
	IL-4	BCGF-1, BSF-1	CD124, CD132
	IL-5	BCGF-2	CD125, βc
	IL-6	IFNβ2, BSF-2, BCDF	CD126, CD130
	IL-7		CD127, CD132
	IL-9		IL-9r, CD132
	IL-10	cytokine synthesis inhibitory factor	IL-10Rα, IL10-Rβc(CRF2-4, IL-10R2)
	IL-11		IL-11R, CD130
	IL-12	NK-cell stimulatory factor	IL-12Rβ1c+IL-12Rβ2
	IL-13	p60	IL-13R, CD132
	IL-15	T-cell growth factor	IL-15Rα, CD122 (IL-2Rβ), CD132
	IL-16		CD4
	IL-17A	mCTLA-8	IL-17AR (CD217)
IL-17F	ML-1	IL-17AR (CD217)	
IL-18	IGIF, interferon α inducing factor	IL-1Rrp (IL-1R related protein)	
IL-19		IL-20Rα+IL-10Rβc	

	IL-20 IL-21 IL-22 IL-23 IL-24 IL-25 IL-26 IL-27 IL-28A,B IL-29 LIF (leukemia inhibitory factor) OSM	IL-TIF 170 (p19)+306 (p40c) heterodimer MDA-7 IL-17E AK155 IFN- λ 2,3 IFN- λ 1 OM (oncostatin M)	IL-20R α +IL10R β c, IL-22R α c+IL-10R β c IL-21R+CD132 IL22R α c+IL10 β c IL-12R β 1+IL-23R IL22R α c+IL-10 β c, IL20R α +IL-10R β c IL-17BR (IL-17Rh1) IL-20R α +IL10R β c WSX-1+CD130c IL-28R α c+IL10R β c IL28R α c+IL-10R β c LIFR, CD130 OSMR, LIFR, CD130
TNF Familie	TNF α LT- α LT- β CD40 ligand (CD40L) Fas ligand (FasL) CD27 ligand (CD27L) CD30 ligand (CD30L) 4-1BBL Trail OPG-L APRIL LIGHT TWEAK BAFF	cachectin lymphotoxin- α Apo-2L RANK-L CD257, BlyS	p55 (CD120a), p75(CD120b) p55 (CD120a), p75(CD120b) LT β R, HVEMEN CD40 CD95 (Fas) CD27 CD30 4-BB DR4, DR5, DCR1, DCR2, OPG RANK, OPG TAC1, BCMA HVEM, LT-R TWEAKR(Fn14) TAC1, BCMA, BR3
nicht zugeordnet	TGF β 1 MIF		TGF β R MIF-R

(modifiziert nach Janeway's immunology 2008)

II. Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine und ihre Rezeptoren		
Chemokine (systematischer Name)	Chemokine (alternativer Name)	Spezifische(r) Rezeptor(en)
CXCL		
CXCL 1	GRO α	CXCR2
CXCL 2	GRO β	CXCR2
CXCL 3	GRO γ	CXCR2
CXCL 5	ENA-78	CXCR2>>CXCR1
CXCL 6	GCP-2	CXCR2>1
CXCL 7	NAP-2 (PBP/CTAP-III β)	CXCR2
CXCL 8	IL-8	CXCR1,2
CXCL 14	BRAK/bolekine	Nicht bekannt
CXCL 15	Lungkine/WECHE	Nicht bekannt
CXCL 4	PF4	CXC3B
CXCL 9	Mig	CXCR3A und B
CXCL 10	IP-10	CXCR3A und B
CXCL 11	I- TAC	CXCRA und B, CXCR7
CXCL 12	SDF-1 α/β	CXCR4/CXCR7
CXCL 13	BLC/BCA-1	CXCR5>>CXCR3
CXCL 16		CXCR6
CCL		
CCL 1	I- 309	CCR8
CCL 2	MCP-1	CCR2
CCL 3	MIP-1 α	CCR1,5
CCL 4	MIP-1 β	CCR5, CCR1
CCL 5	RANTES	CCR1,3,5
CCL 6	C10/MRP-1	CCR 1
CCL 7	MCP-3	CCR1,2,3,5,10
CCL 8	MCP-2	CCR2,3,5>1
CCL 9	MRP-2/MIP-1 γ	CCR1
CCL 11	Eotaxin	CCR3>>CCR5

CCL 12	MCP-5	CCR2
CCL 13	MCP-4	CCR1,2,3>5
CCL 14a	HCC-1	CCR1,5
CCL 14b	HCC-3	Nicht bekannt
CCL 15	MIP-5/HCC-2	CCR1,3
CCL 16	HCC-4/LEC	CCR1,2,5
CCL 17	TARC	CCR4>>8
CCL 18	DC-CK1/PARC	Nicht bekannt
CCL 19	MIP-3 β /ELC	CCR7
CCL 20	MIP-3 α /LARC	CCR6
CCL 21	6Ckine/SLC	CCR7
CCL 22	MDC	CCR4
CCL 23	MPIF-1/CK- β 8	CCR1,5
CCL 24	Eotaxin-2/MPIF-2	CCR3
CCL 25	TECK	CCR9
CCL 26	Eotaxin-3	CCR3
CCL 27	CTACK	CCR10
CCL 28	MEC	CCR10>3
C und C(X ₃)C		
XCL 1	Lymphotactin	XCR1
XCL 2	SCM-1 β	XCR1
C(X ₃)CL 1	Fraktalcine	C(X ₃)CR1

(modifiziert nach Janeway's immunology 2008)

- III. Phylogenetischer Baum der 5'UTR-Sequenzen der Kohorten aus Barcelona und Bonn (S. 156; auf beigelegter CD-ROM)
- IV. Nukleotidsequenzen (S. 157-231; auf beigelegter CD-ROM)
- V. Alignment der GBV-C-E2 Aminosäuresequenz (S. 232-233; auf beigelegter CD-ROM)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Spengler danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung. Ohne seine kompetente Beratung, seine Freundlichkeit und Geduld wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Volker Herzog für die Betreuung seitens der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät und für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. Carolyne Schwarze-Zander danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die zahlreichen Ideen und fachlichen Diskussionen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Immunologischen Labors für die angenehme Atmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft während meiner Labortätigkeit und beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Frau Monika Schulz danke ich für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Aufbereitung der untersuchten Blut- und Serumproben.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass Sie mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Danke Thomas, Dein unerschütterlicher Glauben in mich und Dein Zuspruch haben mir über so manches Tief hinweggeholfen.

Ganz besonders möchte ich meiner Liebsten Nadine für Ihre Liebe, Ihre Geduld und den moralischen Rückhalt-auch in schwierigen Zeiten-danken. Ohne Dich hätte ich es nicht geschafft!