

Systemisch messbare Parameter
zur Detektion des TH1/TH2-Shifts
bei HIV-Infektion

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Mayer, Tobias
aus Lich (Hessen)

Gießen 2005

Kerckhoff-Klinik
Abteilung Rheumatologie, Klinische Immunologie,
Physikalische Medizin und Osteologie
Bad Nauheim

Lehrstuhl für Innere Medizin/Rheumatologie
der Universität Giessen

Leiter: Professor Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Gutachter: PD Dr. med. U. Lange

Gutachter: Prof. Dr. med. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 04.05.2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einführung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Grundlagen der Immunologie	3
1.2.1. Das lymphozytäre System	4
1.2.2. Das T-Zellsystem	4
1.2.3. Antigenabhängige Lymphozytendifferenzierung	6
1.2.4. Antigenerkennung durch T-Helferzellen	7
1.2.5. Antigenerkennung durch zytotoxische / T-Suppressorzellen	7
1.2.6. Die Suppressorschleife	8
1.2.7. Zytokine	8
1.2.8. T-Helferzellsubpopulationen	11
2. Pathophysiologie der HIV-Infektion	13
2.1. Übertragungswege	13
2.2. Morphologie	13
2.3. Suszeptible Zelllinien und Entwicklungszyklus	14
2.4. Verlauf der HIV-Infektion	15
2.4.1. Primärinfektion	15
2.4.2. Klinische Latenz	15
2.4.3. Fortgeschrittene HIV-Infektion und AIDS	16
2.5. Immunpathogenese	18
2.5.1. Funktionsstörung der T-Helferzelle	19
2.5.2. Pathologische Zytokinsekretion durch T-Helferzellen	19
3. Fragestellung	21
4. Methodik	23
4.1. Patientenkollektiv	23

4.2.	Bestimmte Parameter	23
4.3.	Probengewinnung	24
4.4.	Zytokinbestimmung	25
4.4.1	Neopterin	25
4.4.2	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor	26
4.4.3	Lösliches CD23	27
4.5.	Statistische Methoden	28
5.	Ergebnisse	31
5.1.	Einzelergebnisse	31
5.2.	Statistische Auswertung	46
6.	Diskussion	48
7.	Literaturverzeichnis	53
8.	Zusammenfassung	57
9.	Summary	58
10.	Danksagung	59
11.	Lebenslauf	60

1. Einführung

1.1. Einleitung

Als Ende der 1970er Jahre in den USA die ersten Fälle von Pneumocystis-Pneumonie und Kaposi-Sarkom bei zuvor gesunden homosexuellen Männern auftraten, konnte niemand ahnen, welche Ausmaße die Pandemie dieses völlig neuen Krankheitsbildes annehmen würde. Anfangs als Folgeerscheinung von Drogenkonsum oder als „Strafe Gottes“ für diejenigen fehlgedeutet, deren Sexualverhalten nicht gesellschaftlichen Konventionen entsprach, kamen bald erste Vermutungen auf, es könne sich um einen infektiösen Prozess handeln, der sexuell, aber auch durch Blut übertragen wird, da zunehmend Hämophiliepatienten betroffen waren.

1984 gelang den Arbeitsgruppen um Robert Gallo vom National Cancer Institute Bethesda, Maryland, USA und Luc Montagnier vom Institut Pasteur, Paris, Frankreich, nahezu zeitgleich, aber unabhängig voneinander die Isolierung eines bislang unbekanntes Virus, welches im weiteren Verlauf als Erreger der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS (**A**quired **I**mmunodeficiency **S**yndrome) identifiziert werden konnte (43,44).

Seit 1985 steht ein ELISA-Test zur Verfügung, um spezifische Antikörper gegen das mittlerweile als HIV (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) bezeichnete Virus nachzuweisen, der als Screening-Test auch heute diagnostisches Mittel der Wahl ist. Fällt dieser positiv aus, wird trotz hoher Sensitivität und Spezifität eine Bestätigung dieses Befundes mit einer weiteren Methode gefordert, zum Beispiel Western-Blot oder PCR.

Mit zunehmenden Fallzahlen und wachsender Information änderten sich im Laufe der Jahre sowohl die Auffassung vom Krankheitsbild AIDS als auch die Einstellung der Öffentlichkeit vor allem in den Industrienationen sowie der Mediziner. Da opportunistische Infektionen und HIV-assoziierte Tumoren oftmals erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auftreten, war man sich der mitunter jahrelangen Latenzzeit zunächst nicht bewusst und deutete AIDS als akute Immunschwäche mit zunächst unbeeinflussbarem Verlauf. Erste therapeutische Erfolge wurden durch den Einsatz des Nukleotidanalogs Azidothymidin erzielt und mittlerweile steht eine Vielzahl weiterer sehr effektiver Therapeutika zur Verfügung. Der Symptomenkomplex AIDS hat sich von einer akuten zu einer chronischen

Erkrankung entwickelt. Gleichfalls gewandelt hat sich die Einstellung der Gesellschaft gegenüber HIV-infizierten Personen. HIV und AIDS sind längst keine Tabuthemen mehr, ebensowenig wie Homosexualität. Aufklärung und öffentliche Diskussion vornehmlich in den 1990er Jahren haben in den westlichen Industrienationen das Thema AIDS ins Bewusstsein gerückt.

Drei Jahrzehnte nach Identifizierung des Erregers sind mittlerweile einige der grundlegenden Eigenschaften des Virus sowie ein Teil der Pathophysiologie des Krankheitsbildes AIDS geklärt, dennoch sind weiterhin viele Fragen offen. Gerade was die Auswirkungen auf das Immunsystem auf molekularer Ebene angeht, sind noch etliche Mechanismen ungeklärt.

1993 gelang Clerici und Shearer vom National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA der Nachweis, dass, wie tierexperimentell bei der Maus bereits bewiesen, auch beim Menschen die CD4+T-Lymphozyten, Hauptzielzelle von HIV, in der Lage sind, zwei Phänotypen zu generieren, die sich durch das Muster der von ihnen produzierten Zytokine unterscheiden. Dies gelang durch den Nachweis, dass in Überständen von T-Helferzellkulturen HIV-infizierter Personen bestimmte Zytokine in signifikant höherer oder niedrigerer Konzentration als bei immungesunden Kontrollpersonen vorlagen (6,9,23), wobei eine vermehrte Aktivität von gamma-Interferon und Interleukin 2 als Ausdruck einer Prädominanz der im Folgenden als TH1-Population bezeichneten Untergruppe CD4+T-Lymphozyten, sowie erhöhte Spiegel von Interleukin 4 und Interleukin 10 als Ausdruck der Prädominanz der im Folgenden als TH2-Population bezeichneten Gruppe angesehen wurde (6). Dies führte zu der Hypothese, dass es im Laufe der Zeit bei HIV-Patienten zur Depletion des ursprünglich dominierenden Phänotyps 1 (TH1) und im Gegenzug zur vermehrten Aktivität des Phänotyps 2 (TH2) mit entsprechenden Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit des Immunsystems kommt. Die Aktivität der TH1-Population, die sich durch die Produktion von überwiegend proinflammatorischen Zytokinen auszeichnet, unterstützt primär die zelluläre Immunantwort, wohingegen die vom TH2-Typ generierten Zytokine in erster Linie den humoralen Arm der Immunantwort unterstützen. Der progrediente Immundefekt ist somit nicht nur Folge eines quantitativen Verlustes von CD4+T-Lymphozyten, sondern auch Ausdruck einer qualitativen Veränderung im Zuge veränderter Zytokinsekretion.

Der sogenannte TH1/TH2-switch kann mittlerweile als erwiesen angesehen werden (6, 7), offen bleibt jedoch die Frage, wie dieser diagnostiziert werden kann und

welche Konsequenzen aus dieser Erkenntnis zu ziehen sind. Da sich die beiden Zellpopulationen morphologisch bis dato nicht unterscheiden lassen, ergibt sich die Notwendigkeit einer Funktionsdiagnostik mittels Zytokinbestimmung. In den bislang publizierten Untersuchungen waren diese in Überständen aktivierter Lymphozytenkulturen durchgeführt worden, einer aufwendigen und für die Routinediagnostik nur begrenzt geeigneten Methode (6).

Ziel dieser Untersuchung ist es, Aberrationen im Zytokinhaushalt von HIV-Patienten im Serum nachzuweisen und den Verlauf bestimmter Serumzytokinspiegel über die Zeit zu verfolgen, um die Frage zu klären, ob der TH1/TH2-Switch überhaupt im Serum nachweisbar ist.

1.2. Grundlagen der Immunologie

Die vielfältigen Aufgaben des Immunsystems werden durch spezialisierte Zellen und durch lösliche Moleküle wahrgenommen. Dementsprechend lassen sich zelluläre Abwehrmechanismen von humoralen unterscheiden. Einige dieser Mechanismen richten sich spezifisch gegen ein einziges Antigen, andere dagegen sind zur breiten, unspezifischen Abwehr befähigt. Das nachfolgende Schema gibt einen kurzen Überblick über einige dieser Bestandteile des menschlichen Immunsystems (1):

	antigenspezifisch	nicht antigenspezifisch
humoral	Immunglobuline	Komplementsystem
	IgM	Lysozym
	IgG	CRP
	IgA	
	IgE	
zellulär	T-Lymphozyten	Makrophagen
	B-Lymphozyten	Granulozyten
		Mastzellen

Im Folgenden wird hauptsächlich auf die Gliederung und Funktionsweise der T-Lymphozyten eingegangen werden, da T-Helfer-Lymphozyten die Hauptzielzelle von HIV darstellen.

1.2.1. Das lymphozytäre System

Wie in obenstehender Tabelle dargestellt, sind die Lymphozyten, zusammen mit den Immunglobulinen, Teil der antigenspezifischen Abwehr. Sie gliedern sich in zwei Hauptgruppen:

B-Zellen

Diese differenzieren sich bei Vögeln in der bursa fabricii, beim Menschen im Knochenmark (**bone marrow**) aus lymphatischen Blasten und sind unter anderem zur Sekretion von Immunglobulinen befähigt, die den humoralen Arm der spezifischen Abwehr darstellen. B-Lymphozyten sind grundsätzlich CD4-negativ und somit für eine Infektion durch HIV unempfindlich.

T-Zellen

Sie gewährleisten die spezifische zelluläre Immunantwort. Ihre Einteilung in funktionell und morphologisch verschiedene Untergruppen wird nachfolgend besprochen werden.

1.2.2. Das T-Zellsystem

Ausgehend von der pluripotenten Stammzelle entwickeln sich im Knochenmark Vorläuferstufen der Lymphozyten, die sich im Knochenmark selber zu B-Zellen entwickeln oder aber als unreife Vorläuferzellen über die Blutbahn in den Thymus einwandern. Diese Prä-T-Zellen (T steht für Thymus) sind noch nicht zur Abwehrleistung befähigt und erfahren im Thymus erst ihre Prägung auf drei grundlegende Merkmale des T-Lymphozyten.

Antigenspezifität

Die Spezifität eines Lymphozyten für ein einziges Antigen wird über den T-Zellrezeptor vermittelt. Stammzellen besitzen eine Vielzahl von Genen, die für die unterschiedlichen Abschnitte des Rezeptors codieren: C-Gene codieren den konstanten Abschnitt, an den sich eine variable Region anschließt, die von V-Genen (variability genes), D-Genen (diversity genes) und J-Genen (joining genes) codiert wird. Jedes dieser Gene ist unterteilt in verschiedene Segmente, von denen nur jeweils eines für die Synthese eines T-Zellrezeptors ausreicht.

Im Thymus findet ein Rearrangement dieser Segmente statt, wobei nur jeweils eines für die Synthese des Rezeptors beibehalten wird, alle anderen aber verlorengehen. Durch diese zufällige Zusammenstellung des Genmaterials sind ca. 100 Millionen Kombinationen und somit Antigenrezeptoren möglich.

MHC-Restriktion

Um ein körperfremdes Molekül als "fremd" erkennen zu können, muss es den T-Lymphozyten von antigenpräsentierenden Zellen, z.B. Makrophagen/Monozyten, in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert werden. MHC-Moleküle (MHC: major histocompatibility complex) sind Oberflächenantigene, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Der MHC Klasse 1 findet sich auf jeder Zelle, einige immunkompetente Zellen, wie z.B. Makrophagen, B-Zellen und aktivierte T-Zellen tragen zusätzlich den MHC Klasse 2. Die physiologische Bedeutung für die Immunantwort liegt in der Präsentation von antigenem Material. Nur die kombinierte Darbietung von MHC plus Antigen ermöglicht eine Bindung des T-Zellrezeptors und damit die Einleitung einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion.

Im Thymus begegnen die Prä-T-Zellen nach Ausbildung des T-Zellrezeptors zum ersten Mal MHC-Molekülen. Hier lernen sie, diese Struktur als "körpereigen" zu identifizieren. Prä-T-Zellen, deren T-Zellrezeptor eine hohe Affinität für den MHC aufweisen, sind autoreaktiv und werden abgetötet; Zellen mit Rezeptoren niedriger Affinität sterben mangels Stimulation ab. Durch diese Selektion wird es nur Zellen mit Rezeptoren mittlerer Affinität ermöglicht, sich weiter zu differenzieren und zu reifen T-Zellen heranzuwachsen. Weniger als 1% aller Prä-T-Zellen werden so zu immunkompetenten T-Lymphozyten.

Ausbildung der Lymphozytensubpopulationen

Prä-T-Zellen exprimieren sowohl CD4- als auch CD8-Oberflächenmoleküle. Im Thymus begegnen diese Zellen beiden Klassen von MHC-Molekülen. Weist ein T-Zellrezeptor eine höhere Affinität zum MHC Klasse 1 auf, wird bei der weiteren Proliferation das CD4-Molekül nicht weiter exprimiert. Der so entstandene Zellklon ist irreversibel MHC1 / CD8+ / CD4- restringiert. Zellen dieser Spezifität werden als T-Suppressorzellen bezeichnet. Sie erkennen ein Antigen nur in Kombination mit einem MHC Klasse 1 Molekül. Umgekehrt exprimieren Zellen, deren T-Zellrezeptor eine höhere Affinität zum MHC Klasse 2 aufweist, fortan nur noch CD4-

Oberflächenmoleküle. Sie sind MHC2 / CD4+ / CD8- restringiert und werden jetzt als T-Helferzellen bezeichnet.

Diese reifen T-Lymphozyten verlassen den Thymus wieder über die Blutbahn und wandern in die lymphatischen Gewebe ein, auf der stetigen Suche nach "ihrem" Antigen, also der Struktur, die wie nach dem „Schlüssel - Schloss - Prinzip“ zu ihrem T-Zellrezeptor passt. Über die efferenten Lymphbahnen gelangen sie schließlich zurück in die Blutbahn, und der Lymphozytenkreislauf ist geschlossen.

Durch diese Rezirkulation ist eine ständige Umverteilung der Lymphozyten gewährleistet, die auf diese Weise den gesamten Organismus nach antigenem Material "durchsuchen".

1.2.3. Antigenabhängige Lymphozytendifferenzierung

Die bisher beschriebenen Differenzierungsvorgänge sind allesamt unabhängig von der Anwesenheit antigenen Materials. Trifft ein Lymphozyt auf sein spezifisches Antigen, kommt es zur weiteren Differenzierung und Proliferation. Diese Vorgänge sind antigenspezifisch und stellen die eigentliche Immunantwort dar.

Antigenpräsentation

Wie oben bereits beschrieben, erkennen T-Lymphozyten ein Antigen nur dann, wenn es ihnen zusammen mit MHC-Molekülen dargeboten wird.

Exogene Antigene, z.B. Teile von phagozytierten Viren oder Bakterien werden vom Phagozyten, der als antigenpräsentierende Zelle (im Folgenden APC) fungiert, zusammen mit MHC Klasse 2 Molekülen auf seiner Oberfläche dargeboten. Diese Kombination, Antigen + MHC Klasse 2, kann von T-Helferzellen erkannt werden.

Endogene Antigene, z.B. in einer infizierten Zelle produzierte virale Proteine, werden von dieser Zelle auf MHC Klasse 1 Molekülen dargeboten, und können somit von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden.

1.2.4. Antigenerkennung durch T-Helferzellen

Das CD4-Molekül, charakteristisches Oberflächenantigen der T-Helferzelle, dient als Rezeptor für MHC Klasse 2 Proteine. Die Interaktion beider Moleküle ermöglicht die enge Aneinanderlagerung von T-Helferzelle und antigenpräsentierender Zelle (APC) als Voraussetzung für das Abtasten des Phagozyten nach antigenem Material. Ist kein Antigen vorhanden, welches zum T-Zellrezeptor passt, löst sich die T-Helferzelle wieder ab und setzt ihre Suche fort. Wird sie jedoch fündig, kommt es zur Quervernetzung mehrerer T-Zellrezeptoren, was das Signal für die Lymphozytenaktivierung darstellt - die antigenspezifische Immunantwort beginnt.

Die bislang "antigen-nativen" Lymphozyten transformieren zu Blasten und beginnen zu proliferieren. Unter dem Einfluss von Interleukin 2, einem Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten, entsteht innerhalb weniger Tage ein für dieses Antigen spezifischer T-Helferzellklon.

1.2.5. Antigenerkennung durch zytotoxische / T-Suppressorzellen

Wie oben bereits beschrieben sind CD8+ T-Lymphozyten in der Lage, Antigene in Verbindung mit MHC Klasse 1 Molekülen zu erkennen. Somit ist jede Zelle des Körpers in der Lage, antigene Strukturen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Bei Zellen, die nicht zur Phagozytose befähigt sind, handelt es sich hierbei z.B. um virale Peptide, die von virusinfizierten Zellen dargeboten werden. Trifft eine zytotoxische T-Zelle auf einen MHC Klasse 1 / Antigen - Komplex, der zu ihrem T-Zellrezeptor passt, beginnt auch sie unter dem Einfluss des von ihr selbst sezernierten Interleukin 2 zu proliferieren und zu aktivierten Killerzellen heranzureifen.

Diese Killerzellen sind in der Lage, virusinfizierte Zellen abzutöten. Ähnlich den T-Helferzellen lagern auch sie sich eng an die antigenpräsentierende Zelle an. Sobald der T-Zellrezeptor seinen Liganden gebunden hat, setzen sie Perforine in den Interzellulärspalt frei, welche Membrandefekte bei der Zielzelle erzeugen und diese somit abtöten.

1.2.6. Die Suppressorschleife

Die T-Zellaktivität unterliegt einem Regelmechanismus, einer "feedback inhibition", an der sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen beteiligt sind. Eingeleitet wird die Suppression von einer T-Helferzelle, einer sog. T-Suppressor-Inducerzelle, die, antigenspezifisch aktiviert, einen Faktor sezerniert, der auf eine bestimmte CD8+ T-Zellpopulation einwirkt, die sogenannten T-Suppressor-Effektorlymphozyten. Diese wiederum hemmen die entsprechenden antigen-spezifischen Helferzellpräkursoren. Auf diese Weise wird die Immunantwort sowohl zeitlich als auch in ihrer Intensität begrenzt.

1.2.7. Zytokine

Es sind unterschiedliche Formen des Informationsaustauschs zwischen Zellen möglich. Entweder durch direkten Zell-zu-Zellkontakt oder aber mittels löslicher Faktoren, die als Botenstoffe fungieren, den Zytokinen. Die Zellen des Immunsystems bedienen sich u.a. letzterer Möglichkeit, um Informationen zu vermitteln.

Der Begriff Zytokine beschreibt eine große Anzahl löslicher Faktoren niedrigen Molekulargewichts (meist 15 - 25 kDa), die früher ihrer Herkunft nach als Lymphokine und Monokine oder auch als Interferone bezeichnet wurden. Im Zuge der weitergehenden Erforschung dieser Substanzen stellte sich jedoch heraus, dass diese nicht nur eine einzige Wirkung auf einen Zelltyp ausüben, sondern durchaus unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedene Zellpopulationen haben. Auch werden Zytokine meist nicht nur von einer einzelnen Zellgruppe sezerniert, sondern von mehreren, so dass die ursprüngliche Benennung nach produzierender Zelle zwangsläufig ungenau und unzureichend wurde. Die Wirkungsweise von Zytokinen ist also pleiotrop, wobei der Effekt von Zelle zu Zelle verschieden sein kann.

Zytokine werden nicht in spezialisierten Drüsen produziert, sondern von Zellen, die nicht zwangsläufig parenchymatös organisiert sind. Dementsprechend beschreibt der Begriff all jene Botenstoffe, die nicht klassischerweise den Hormonen zugerechnet werden, obwohl ihre Funktionsweise durchaus mit der von Hormonen verglichen werden kann.

Viele Zytokine wirken parakrin oder selbst autokrin, sind also oftmals von sehr geringer Reichweite.

Die Regulationsmechanismen, die durch Zytokine vermittelt werden, sind äußerst vielfältig. So kontrollieren sie beispielsweise die Hämatopoese oder die Dauer und Stärke von Immunreaktionen.

Einige der für die Regulation der Immunantwort wichtigen Zytokine sollen nachfolgend vorgestellt werden (2,3,4,11,12,40,41).

Interleukin 1 (IL 1)	
Quelle:	Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferation und Differenzierung von B-Zellen ▪ Zytokinfreisetzung durch aktivierte T-Zellen ▪ Wachstum von Fibroblasten, Synovialzellen und Endothelzellen ▪ Freisetzung von Prostaglandin E2 und Akute-Phase-Proteinen ▪ Fieber ▪ Steigerung der Killerzellaktivität ▪ Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten

Interleukin 2 (IL 2)	
Quelle:	Aktivierte T-Lymphozyten
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferation und Differenzierung von B-Zellen ▪ Wachstum von aktivierten T-Zellen und Thymozyten ▪ Lymphokinproduktion von T-Zellen ▪ Steigerung der Aktivität von Natürlichen Killerzellen Steigerung der Aktivität zytotoxischer T-Zellen

Interleukin 4 (IL 4)	
Quelle:	Aktivierte T-Zellen, Mastzellen, aktivierte B-Zellen
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferation von B-Zellen ▪ Wachstum von T-Zellen, Thymozyten und Mastzellen ▪ Steigerung der Aktivität zytotoxischer T-Zellen ▪ Aktivierung hämatopoetischer Zellen

Interleukin 6 (IL 6)	
Quelle:	T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produktion von Akute-Phase-Proteinen ▪ Steigerung der Expression von MHC Klasse 1 Molekülen durch Fibroblasten ▪ Wachstum von Plasmazytomen und Hybridomen

Interleukin 10 (IL 10)	
Quelle:	Aktivierte T- und B-Zellen, B-Zelllymphome, mitogenstimulierte Monozyten und Mastzellen
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibition der Synthese von Interferon-gamma, Interleukin 2 und Tumor-Nekrose-faktor-β durch T-Helferzell 1 Subpopulation ▪ Steigerung der Differenzierung zytotoxischer T-Zellen ▪ Steigerung der MHC Klasse 2 Expression auf B-Zellen ▪ Reduktion der MHC Klasse 2 Expression auf Monozyten ▪ Chemotaktischer Faktor für CD8+, aber nicht für CD4+ Lymphozyten

Interferon-gamma (IFN-gamma)	
Quelle:	T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen
Wirkungen:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verminderung viraler Replikation in infizierten Zellen ▪ Steigerung der Expression von MHC Klasse 2 Molekülen auf Makrophagen ▪ Steigerung der Expression von MHC Klasse 1 Molekülen auf Endothelzellen und Fibroblasten ▪ Steigerung der Aktivität Natürlicher Killerzellen ▪ Steigerung der antimikrobiellen Aktivität von Makrophagen

1.2.8. T-Helferzellsubpopulationen

1986 konnten Mosmann et al. zeigen, dass CD4+ T-Lymphozyten der Maus keine funktionell einheitliche Zellgruppe darstellen, sondern sich durch das Muster der von ihnen sezernierten Zytokine und die damit verbundenen Funktionen deutlich unterscheiden (10). Der T-Helferzelltyp 1 (im Folgenden TH1) produziert IL 2 und IFN-gamma, nicht aber IL 4 und IL 5, wohingegen der T-Helferzelltyp 2 (im Folgenden TH2) IL 4, IL 5 und IL 10 sezerniert, nicht aber IL 2 und IFN-gamma (5, 7, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24).

Die Versuche, ähnliche Phänotypen auch bei Menschen nachzuweisen, scheiterten zunächst, da sich keine so klaren Verteilungsmuster erkennen ließen. Mittlerweile ist es jedoch gelungen, auch beim Menschen TH1- und TH2-Subpopulationen auszumachen (5, 7).

Ausgehend von einer TH0-Zelle, die in der Lage ist, die ganze Bandbreite von T-Helferzellzytokinen zu produzieren, differenzieren sich zwei Populationen unterschiedlichen Phänotyps:

TH0	
IL 2	IL 4
IL 3	IL 5
IFN-gamma	IL 6
TNF-beta	IL 10
TNF-alpha	IL 13
GM-CSF	

TH1	
IL 2	TNF-beta
IL 3	TNF-alpha
IFN-gamma	GM-CSF

TH2	
IL 3	IL 6
IL 4	IL 10
IL 5	IL 13

Betrachtet man die Wirkungen der oben aufgeführten Zytokine, stellt sich schnell heraus, dass die beiden Subpopulationen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Die Gruppe der TH1-Zellen kontrolliert vorwiegend die zelluläre Immunantwort (6); so regelt beispielsweise IL 2 Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, steigert die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen und erhöht die Zytokinproduktion durch aktivierte T-Zellen. IFN-gamma bewirkt durch Steigerung der Expression beider Klassen von MHC-Molekülen eine verstärkte Antigenerkennung durch CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (2, 3, 4,40,41).

Die Population der TH2-Zellen hingegen regelt vornehmlich den humoralen Arm der Immunantwort, besonders hinsichtlich parasitärer Infektionen, z.B. durch IL 4 induzierten Antikörperisotypenswitch mit vermehrter Produktion von IgE, IL 5 induzierter Eosinophilie und IL 3/IL 4 stimulierter Mastzell-Proliferation.

Beide Populationen kontrollieren sich gegenseitig mittels ihrer Zytokine; so ist beispielsweise IL 10 ein potenter Inhibitor der Synthese von TH1 Zytokinen wie IFN-gamma, IL 2 und TNF-beta, während die Proliferation von TH2 Zellen durch IFN-gamma unterdrückt wird (6). Beim Immungesunden ist so ein Gleichgewicht beider Populationen gewährleistet und überschießende Reaktionen eines Zelltyps auf Kosten des anderen werden vermieden. Mittlerweile sind jedoch einige Erkrankungen

bekannt, bei denen eine Störung eben diesen Gleichgewichts als einer der pathophysiologischen Mechanismen angenommen wird. Zur Bedeutung der TH1/TH2 Populationen bei HIV und AIDS sei auf das Kapitel "Pathophysiologie der HIV-Infektion" verwiesen.

2. Pathophysiologie der HIV-Infektion

2.1. Übertragungswege

Als infektiös wurden mittlerweile folgende Sekrete identifiziert:

- Blut
- Sperma
- Vaginalsekret

Wenngleich auch andere Körperflüssigkeiten wie Speichel und Urin HIV enthalten können, dann doch in so geringem Maße, dass eine Übertragung durch sie sehr unwahrscheinlich ist. Demzufolge kommen hauptsächlich Situationen für eine Ansteckung mit HIV in Betracht, bei denen es zu intensivem Kontakt mit den o. g. Sekreten kommt. Es sind dies vor allem:

- ungeschützter Geschlechtsverkehr
- Übertragung von infiziertem Blut oder Blutprodukten
- Übertragung von der Mutter auf das Kind, v. a. unter der Geburt

2.2. Morphologie

Der in Europa und den USA vorherrschende Virustyp HIV I ist, ebenso wie der in Afrika vorherrschende Typ HIV-II, ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Bis heute kennt man vier humanpathogene Retroviren, die humanen T-lymphotropen Viren HTLV-I und-II sowie die beiden humanen Immundefektviren HIV-I und -II.

HIV-II, das anfangs nur in Westafrika auftrat und auch heute in Europa nur vereinzelt anzutreffen ist, stimmt zwar in seiner Nukleotidsequenz zu 40% mit HIV-I überein, ist

aber enger mit dem Affen-Immundefekt-Virus SIV (simian immunodeficiency virus) verwandt und soll hier nicht näher besprochen werden.

2.3. Suszeptible Zelllinien und Entwicklungszyklus

Viren sind obligate Zellparasiten, da sie keinen oder nur einen inkompletten Stoffwechselapparat besitzen und somit auf Wirtszellen angewiesen sind, mit deren Enzymsysteme sie sich vermehren können. Der Entwicklungszyklus von HIV beginnt mit der hochaffinen Bindung des Oberflächenmoleküls gp120 an seinen Rezeptor, das CD4-Molekül. Dieses Protein wird hauptsächlich von T-Helferlymphozyten exprimiert, die damit die Hauptzielzelle des Virus darstellen. Allerdings tragen auch Makrophagen und Monozyten dieses Molekül, wenn auch in geringerer Anzahl. Dennoch werden auch diese Zellen infiziert, was fatale Folgen hat, da sich Monozyten in jedem Gewebe ansiedeln und somit erheblich zur Ausbreitung des Virus beitragen.

Nach der Bindung an den Rezeptor findet eine gp41-vermittelte Fusion statt, bei der die Lipidmembran verlorenght und die virale RNA in die Wirtszelle freigesetzt wird. Da RNA von humanen Zellen nicht als Genom erkannt und abgelesen werden kann, findet zuerst eine Umschreibung in DNA statt, die von dem im Virus enthaltenen Enzym *Reverse Transkriptase* katalysiert wird.

Dieser Vorgang des Umschreibens von RNA zu DNA gab den Retroviren ihren Namen, da alle anderen Zellen DNA enthalten, die in RNA umgeschrieben wird und der Vorgang der reversen Transkription somit gewissermaßen "rückwärts" abläuft.

Ein weiteres virales Enzym, die *Integrase*, katalysiert den nächsten Schritt, den Einbau der viralen Erbinformation in das Genom der Wirtszelle. Die so eingebaute Sequenz wird bei Aktivierung der Zelle abgelesen, es kommt zur Bildung von Virus-mRNA, mittels derer vom Proteinsyntheseapparat der Zelle die entsprechenden Eiweiße produziert werden.

An der Zellmembran kommt es dann zum Assembly, dem Zusammenbau der einzelnen Virusbausteine. Beim Durchtritt durch die Membran der Wirtszelle erhält das Virus schließlich die Lipidumhüllung und gelangt als komplettes, infektiöses Partikel in die Zirkulation.

2.4. Verlauf der HIV-Infektion

2.4.1. Primärinfektion

Personen, die sich erstmalig mit HIV infizieren, erleiden häufig ein sogenanntes "akutes HIV-Syndrom" mit Mononukleose-ähnlichen Symptomen. In dieser Phase, in der noch keine spezifischen Abwehrmaßnahmen vorhanden sind, kommt es zu einer initial erheblichen Virämie und Virusaussaat. Das Ausmaß der Virämie ist bedeutsam für die Prognose des Fortschreitens der HIV-Infektion, da bei starker Aussaat entsprechend mehr suszeptible Zellen infiziert werden können und somit eine vermehrte Virussyntese stattfinden kann.

Mit Einsetzen der spezifischen Immunantwort, sowohl zellulär als auch humoral, nimmt die Virämie ab, die Symptome schwinden und es kommt zum Übergang in ein interindividuell unterschiedlich langes Stadium der klinischen Latenz (5, 8).

2.4.2. Klinische Latenz

In dieser Zeit ist der Patient zunächst symptomfrei, jedoch findet weiterhin eine Virusreplikation auf individuell unterschiedlich hohem Niveau statt, die durch das Einsetzen spezifischer Abwehrmaßnahmen in ihrem Ausmaß begrenzt wird. Die Höhe der Viruslast in dieser Zeit ist einer der Faktoren, die für die individuell sehr unterschiedliche Dauer der klinischen Latenz verantwortlich ist. Dennoch kommt es zu einem fortschreitendem Verlust von T-Helferzellen. Dies ist zunächst von konstitutionellen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Konzentrationsschwäche und Minderung der körperlichen Leistungsfähigkeit sowie unklaren Lymphknotenschwellungen, subfebrilen Temperaturen und Nachtschweiß begleitet. Schließlich sinkt die Anzahl der CD4+T-Lymphozyten auf kritisch niedrige Werte, was mit einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen und Entwicklung bestimmter Tumoren, z. B. dem Kaposi-Sarkom, einhergeht (5, 8).

2.4.3. Fortgeschrittene HIV-Infektion und AIDS

Der Begriff AIDS ist definiert als HIV-Infektion zusammen mit einer bestehenden oder durchgemachten opportunistischen Infektion oder bestimmten malignen Erkrankung, die nach der CDC-Klassifikation von 1993 in der Kategorie C als AIDS-definierende Erkrankungen zusammengefasst sind.

Klinische Kategorien der HIV-Infektion, CDC-Klassifikation

Kategorie A

- Asymptomatische HIV-Infektion
- Akute primäre HIV-Infektion
- Persistierende generalisierte Lymphadenopathie

Kategorie B

Erkrankungen, die nicht in die Kategorie C fallen, dennoch aber der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind.

Hierzu zählen:

- Bazilläre Angiomatose
- Entzündungen des kleinen Beckens insbesondere als Komplikation eines Tuben- oder Ovarialabszesses
- Herpes zoster bei Befall mehrerer Dermatome oder nach Rezidiv in einem Dermatom
- Idiopathische thrombozytopenische Purpura
- Fieber > 38,5° C oder eine > 1 Monat andauernde Diarrhoe
- Listeriose
- Orale Haarleukoplakie
- Oropharyngeale Candidiasis
- Vulvovaginale Candidiasis, > 1 Monat bestehend
- Zervikale Dysplasie oder Carcinoma in situ
- Periphere Neuropathie
- Konstitutionelle Symptome

Kategorie C

AIDS-definierende Erkrankungen

- Candidiasis der Bronchien, Trachea oder Lunge
- Ösophageale Candidiasis
- CMV-Infektion ausser Leber, Milz oder Lymphknoten
- CMV-Retinitis
- HIV-bedingte Enzephalopathie
- Herpes simplex Ulcera > 1 Monat bestehend
- Herpes simplex Infektion der Bronchien, Lunge oder Ösophagus
- Disseminierte oder extrapulmonale Histoplasmose
- Isosporiasis, > 1 Monat persistierend
- Kaposi-Sarkom
- Kokzidioidomykose
- Kryptokokkose
- Kryptosporidiose, > 1 Monat bestehend
- Burkitt-Lymphom
- immunoblastisches Lymphom
- primär zerebrales Lymphom
- Infektion mit atypischen Mycobakterien
- Pneumocystis carinii Pneumonie
- Rezidivierende bakterielle Pneumonie, >2 innerhalb eines Jahres
- Progressive multifokale Leukenzephalopathie
- Salmonellenseptikämie
- Tuberkulose
- Zerebrale Toxoplasmose
- Wasting-Syndrom
- invasives Zervixcarcinom

Zusätzlich geht die Konzentration der CD4+ Zellen in die Stadieneinteilung mit ein:

Laborkategorien der CDC-Klassifikation
Kategorie 1: ≥ 500 CD4+ Zellen/ μ l
Kategorie 2: 200-499 CD4+ Zellen/ μ l
Kategorie 3: < 200 CD4+ Zellen / μ l

Jeder klinischen Kategorie wird eine der Laborkategorie zugeordnet, so dass schließlich neun Stadien der HIV-Infektion unterschieden werden können:

	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3

Verantwortlich für diese erhöhte Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Krankheitserregern oder den oben aufgeführten Malignomen sind, neben dem quantitativen Verlust von T-Helferlymphozyten, eine Reihe HIV-induzierter, pathologischer Veränderungen immunkompetenter Zellen, die zu qualitativen Funktionseinbußen führen.

Einige dieser Veränderungen sollen im Folgenden kurz angesprochen werden, ausführlich jedoch nur die Pathologie der Zytokinsekretion durch T-Helferzellen (5, 8).

2.5. Immunpathogenese

Den Lymphknoten als Filterstation kommt bei der Eindämmung der Ausbreitung von HIV besondere Bedeutung zu. Das Netzwerk follikulär-dendritischer Zellen ist in der Lage, die Viren abzufangen und einen Übertritt in die Zirkulation teilweise zu verhindern. Die über Jahre hinweg anhaltende relative Suppression der Virämie während der Phase der klinischen Latenz ist unter anderem auf diesen Mechanismus zurückzuführen. Die häufig in diesem frühen Stadium der Erkrankung festzustellende persistierende, generalisierte Lymphknotenschwellung (LAS, Lymphadenopathie-syndrom) ist Ausdruck der fortwährenden Auseinandersetzung des Immunsystems

mit dem Erreger. Im Laufe der Zeit allerdings wird dieses Filtersystem durchlässig, es kommt zur Zerstörung der Keimzentren und zum Wiederanstieg der Plasmavirämie, was eine weitere Progression der Erkrankung zur Folge hat.

B-Lymphozyten fallen durch pathologische Aktivierung und erhöhte Spontanproliferation auf, was sich durch eine Hypergammaglobulinämie, zirkulierende Immunkomplexe und Autoantikörper bemerkbar macht (5, 8, 1).

2.5.1. Funktionsstörung der T-Helferzellen

Die bis heute nachgewiesenen oder vermuteten Mechanismen, die zur Depletion oder qualitativen Funktionseinbußen der CD4+T-Lymphozyten führen, sind vielfältig. Die folgende Darstellung gibt einen Überblick:

- HIV-bedingte direkte Zytotoxizität (Abtötung HIV-infizierter Zellen)
- HIV-bedingte Synzytienbildung
- Virus-spezifische Immunreaktionen:
 - HIV-spezifische zytolytische T-Lymphozyten
 - Autoimmunmechanismen
 - Anergie infolge der Übermittlung falscher Signale an die Zellen durch Interaktion von gp120 und CD4-Molekülen
 - Programmierter Zelltod (Apoptose)

2.5.2. Pathologische Zytokinsekretion durch T-Helferzellen

Im Kapitel "Grundlagen der Immunologie" wurde auf die Zytokinsekretion durch T-Helferzellen beim Immungesunden bereits eingegangen. Hier sollen nun Veränderungen im Zytokinsekretionsmuster der T-Helferzellen HIV-infizierter Personen besprochen werden, die möglicherweise maßgeblich für die gestörte Funktion der CD4+T-Lymphozyten mitverantwortlich sind.

Clerici und Shearer wiesen 1993 in T-Helferzellkulturen asymptomatischer HIV-infizierter Personen Zytokinkonzentrationen nach, die sich deutlich von denen nicht HIV-Infizierte unterschieden.

Abhängig von der Zeit, die seit der Serokonversion vergangen war, ließen sich erniedrigte IL 2- und IFN-gamma-Spiegel sowie erhöhte IL 4- und IL 10-Konzentrationen feststellen (6).

3. Fragestellung

Die HIV-Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine mitunter jahrelange Phase der klinischen Latenz. Mikrobiologisch betrachtet ist die Infektion jedoch nicht inaktiv, im Gegenteil, täglich werden ca 1 Milliarde Viren produziert (45), gefolgt von der Neubildung von vielen Millionen T-Helferzellen. In Anbetracht der Tatsache, dass viele Patienten zwar klinisch asymptomatisch waren, jedoch permanent eine hohe Serumkonzentration an Viren aufwiesen, die wiederum zur Neuinfektion CD4-positiver Zellen führten, wurde immer wieder diskutiert, wann der beste Zeitpunkt zum Beginn einer antiretroviralen Therapie sei –entweder möglichst frühzeitig, um ein weiteres Absinken der Konzentration der T-Helferzellen und die Infektion anderer CD4-positiver Zellen zu vermeiden oder möglichst spät, um symptomatischen Patienten einen klinischen Benefit zu verschaffen ohne asymptomatische Patienten mit den teils erheblichen Nebenwirkungen zu belasten.

1995, zu Beginn dieser Untersuchung, wurde die Antwort auf diese Frage größtenteils von der Konzentration der T-Helferzellen abhängig gemacht. Der mittlerweile etablierte Marker Viruslast spielte seinerzeit noch keine Rolle. 1992 konnte die Concordestudie (46) zeigen, dass bei einer Monotherapie mittels AZT kein Unterschied zwischen frühzeitig versus spät einsetzender Behandlung bestand.

In Anbetracht tierexperimentell gewonnener Daten, die die Vermutung nahelegten, dass neben dem quantitativen Verlust von T-Helferzellen auch qualitative Veränderungen der T-Helferzellfunktion als Folge veränderter Zytokinsekretion mit entsprechenden Auswirkungen auf Induktion und Regulation der Immunantwort für den Immundefekt HIV-infizierter Patienten verantwortlich waren, schien die Etablierung von Surrogatmarkern, die eben jene Qualitätsänderungen zu detektieren vermochten, von großem klinischen Interesse (6,9,23).

Ausgehend von den einführenden Kapiteln über das lymphozytäre System und die Pathophysiologie der HIV-Infektion sowie tierexperimentellen Daten zum TH1/TH2-Shift ist das Ziel dieser Arbeit, Aberrationen der Serumspiegel von Zytokinen bzw. von korrespondierenden Ersatzparametern (hier: Neopterin und sIL2R als Marker der TH1-Population sowie sCD23 als Marker der TH2-Population) bei Patientin mit HIV-Infektion zu detektieren und somit Marker zu etablieren, die es ermöglichen, den TH1/TH2-Switch anhand von Serumparametern festzustellen (6,9,23). Mit Hilfe dieser Surrogatmarker wäre zum einen denkbar, den Zeitpunkt für den Beginn einer antiretroviralen Therapie näher bestimmen zu können und quasi den qualitativen

Defekt der Immunantwort als kritischen Wendepunkt im Verlauf der HIV-Infektion zu betrachten. Zum anderen könnten sich diese Marker eignen, ein sekundäres Therapieversagen unter antiretroviraler Therapie frühzeitig zu detektieren. Bislang stehen hierfür die Konzentration der T-Helferzellen sowie die Viruslast zur Verfügung. Auf den Zusammenhang zwischen bestimmten, für die jeweilige Helferzellsubpopulation typischen Zytokinen und den stattdessen analysierten Ersatzparametern wird im folgenden Kapitel eingegangen werden. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob diese Veränderungen im Zusammenhang mit der Konzentration der T-Helferzellen stehen.

4. Methodik

4.1. Patientenkollektiv

In die Untersuchung wurden 14 männliche und 8 weibliche Patienten aus der HIV-Ambulanz der 3. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Justus Liebig Universität Gießen eingeschlossen, die folgende Eingangsbedingungen aufwiesen:

- Konzentration der T-Helferzellen 0 - 500/ μ l
- kein akuter Infekt zu Studienbeginn
- kein Stadium C nach der CDC-Klassifikation zu Studienbeginn

Es wurden 3 Blutentnahmen im Abstand von jeweils 6 Monaten durchgeführt, die nachfolgend als Zeitpunkte 1, 2 und 3 bezeichnet werden.

Zum Ende der Untersuchung ließen sich die Daten von 13 Patienten, 9 männlichen und 4 weiblichen auswerten. Die übrigen Patienten waren größtenteils mangels Compliance nicht zu den Untersuchungsterminen erschienen, zwei Patienten verstarben während der Studie.

4.2. Bestimmte Parameter

Die Bestimmung von Zytokinen im Serum stößt aufgrund kurzer Halbwertszeiten oder Kreuzreagibilität schnell an die Grenzen des Durchführbaren (3); oftmals empfiehlt es sich daher, nicht das Zytokin selbst, sondern einen Ersatzparameter zu bestimmen. Für die Studie wurden drei Zytokine ausgewählt, die typischerweise die Aktivität der TH1/TH2-Population widerspiegeln und durch Parameter ersetzt, die eine hohe Korrelation mit diesen aufweisen, jedoch verlässlichere Werte liefern:

Interferon gamma,

ein Marker für die TH1-Population, wurde ersetzt durch **Neopterin**, welches von Makrophagen nach Stimulation und Aktivierung durch IFN - gamma freigesetzt wird. Neopterin gilt als verlässlicher Marker für erhöhte/erniedrigte IFN-gamma Spiegel sowie als Maß für den Aktivierungszustand des zellulären Immunsystems (25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

Interleukin 2 (IL 2),

ebenfalls ein Marker für die TH1-Population, wurde durch die lösliche Form seines Rezeptors ersetzt, **sIL2R** (40,41).

Interleukin 4 (IL 4),

freigesetzt von TH2-Zellen, wurde ersetzt durch lösliches CD23, **sCD23**, ein Oberflächenantigen, das von antigenaktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert und sezerniert wird. Die Synthese von CD23 wird durch IL 4 induziert und kann somit als Maß für die Höhe des IL 4 Spiegels gelten (13, 14, 35, 36, 37, 38, 39).

4.3. Probengewinnung

Es wurden drei Blutentnahmen im Abstand von jeweils sechs Monaten durchgeführt. Dieses Intervall entsprach der seinerzeit üblichen turnusgemäßen Routineuntersuchung in der HIV-Ambulanz der Medizinischen Poliklinik Gießen bei HIV-Patienten, die sich nicht im Stadium C nach der CDC-Klassifikation befanden. Lediglich bei zwischenzeitlich auftretenden gesundheitlichen Beschwerden erfolgte eine kurzfristigere Einbestellung. Neben der Bestimmung der Konzentration der CD4+ Lymphozyten wurde Plasma wie folgt gewonnen und separiert: jeweils zwei Röhrchen zu 10 ml EDTA-Blut wurden abgenommen und unmittelbar nach Abnahme bei 8°C und 5000 Umdrehungen/min 5 Minuten lang zentrifugiert (Minifuge RF, Heräus Sepatech GmbH). Der so gewonnene Überstand wurde in Portionen zu jeweils 1 ml in Kryokonservierungsröhrchen abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, um den Abbau der Zytokine zu unterbinden und anschließend bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.4. Zytokinbestimmung

4.4.1. Neopterin

Zur Bestimmung verwendeten wir das „Neopterin Milenia“ Kit der Firma Diagnostic Products Corporation Hermann Biermann GmbH Bad Nauheim, Deutschland. Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Neopterin im Serum. In dem mit Anti-Kaninchen-Antikörpern der Ziege beschichteten Mikrotiterstreifen werden die Proben und die Standards mit Peroxidase-markiertem Neopterin und für Neopterin spezifischem Antiserum vom Kaninchen gemischt. Das unmarkierte Antigen verdrängt einen Teil des markierten Antigens von den Bindungsstellen am Anti-Neopterin-Antikörper. Durch Waschen werden anschliessend die freien von den gebundenen Antigenen getrennt.

Das vorgeschriebene Zeitfenster zwischen Probenentnahme und Zytokinbestimmung sowie die Lagerungsbedingungen für die Proben und das Testkit wurden jeweils eingehalten.

Testcharakteristik des „Neopterin-Milena“ Enzym-Immunoassay

<u>Referenzbereich</u>	<u>Sensitivität</u>	<u>Präzision (durchschnittlich)</u>	
(95%-Konfidenzintervall) bei Raumtemperatur	(niedrigster nachweisbarer Wert)	Intra-Assay Variationskoeffizient	Inter-Assay Variationskoeffizient
1,0 – 100 nmol/l	0,7 nmol/l	3,6%	7,6%

4.4.2. Löslicher Interleukin 2 Rezeptor

Hier wurde ebenfalls ein Test der Firma Diagnostic Products Corporation Hermann Biermann GmbH Bad Nauheim, Deutschland, verwendet, das „Solubile Interleukin-2-Rezeptor- Milenia“ Kit. Es handelt sich um einen immunometrischen Enzym-Immunoassay mit Flüssigphaseninkubation und anschließender Festphasentrennung zur quantitativen Bestimmung des löslichen Interleukin 2 Rezeptors in Serum oder Plasma. Die Proben und die Standards werden zusammen mit im Überschuss vorhandenen monoklonalen Ligand-gekoppelten Interleukin 2 Rezeptor-Antikörpern und monoklonalen, mit Meerrettichperoxidase-markierten Antikörpern in Ligand-beschichtete Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation erkennen diese spezifischen Antikörper unterschiedliche Epitope der in den Proben vorhandenen IL 2 R-Moleküle und bilden einen Sandwichkomplex, der aus beiden Antikörpern und dem eingeschlossenen IL 2 Rezeptor besteht. Durch Zugabe eines multivalenten Antiliganden werden die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe während der folgenden 60-minütigen Inkubation an der Wand der Vertiefungen mobilisiert. Ungebundene Reaktionspartner werden beim anschließenden Waschen entfernt. Zugegebenes Substrat, TMB, wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt.

Das vorgeschriebene Zeitfenster zwischen Probenentnahme und Zytokinbestimmung sowie die Lagerungsbedingungen für die Proben und das Testkit wurden jeweils eingehalten.

Testcharakteristik des „Solubile Interleukin-2-Rezeptor“ Enzym-Immunoassay

Referenzbereich	Sensitivität	<u>Präzision (durchschnittlich)</u>	
(95%-Konfidenzintervall) bei Raumtemperatur	(niedrigster nachweisbarer Wert)	Intra-Assay Variationskoeffizient	Inter-Assay Variationskoeffizient
35-900 U/ml	16 U/ml	4,5%	6,7%

4.4.3. Lösliches CD23

Hierfür wurde das „sCD23-Milenia“ Kit der Firma Diagnostic Products Corporation Hermann Biermann GmbH Bad Nauheim, Deutschland, verwendet. Es handelt sich um einen Sandwich-Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des sCD23 im Serum. In dem mit Anti-Kaninchen-Antikörpern der Ziege beschichteten Mikrotiterstreifen werden die Proben und die Standards mit Peroxidase-markiertem sCD23 und für sCD23 spezifischem Antiserum vom Kaninchen gemischt. Das unmarkierte Antigen verdrängt einen Teil des markierten Antigens von den Bindungsstellen am Anti-sCD23-Antikörper, anschließend wird durch Waschen das ungebundene Antigen entfernt.

Das vorgeschriebene Zeitfenster zwischen Probenentnahme und Zytokinbestimmung sowie die Lagerungsbedingungen für die Proben und das Testkit wurden jeweils eingehalten.

Testcharakteristik des „Solubile CD23“ Enzym-Immunoassay

Referenzbereich (95%-Konfidenz- intervall) bei Raumtemperatur	Sensitivität (niedrigster nachweisbarer Wert)	Präzision (durchschnittlich)	
		Intra-Assay Variations- koeffizient	Inter-Assay Variations- koeffizient
2-91 U/ml	0,5 U/ml	6,2%	7,5%

Für immungesunde Personen wurden folgende Normwerte vom Hersteller angegeben:

sIL2R:	85 -961 U/ml; Mittelwert 523 U/ml
Neopterin:	< 15 nmol/l
sCD23:	2-91 U/ml; Mittelwert 37 U/ml
CD4+ Lymphozyten:	Der Normwert für CD4+ Lymphozyten liegt je nach Labor für Immungesunde bei ca. 500-1000/µl

4.5. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten wurde durchgeführt vom Statistikbüro Reitz und Mogk in Gießen.

Zur Überprüfung von wissenschaftlichen Vermutungen werden statistische Hypothesen aufgestellt. Sie sind bei Gruppenvergleichen meist so formuliert, dass das Ziel des Anwenders das **Ablehnen** der Hypothese ist. Als Signifikanzniveau (Fehler 1. Art, Fehlerwahrscheinlichkeit oder p-Wert) wird diejenige Wahrscheinlichkeit bezeichnet, mit der man irrtümlich eine richtige Hypothese ablehnt. Will man einen geringen Fehler beim Ablehnen der Hypothese machen, so sollte diese Wahrscheinlichkeit klein sein, übliche Schranken sind $\alpha=0,05$ und $\alpha=0,01$. In dieser Arbeit wurde mit dem Signifikanzniveau von 5% gearbeitet.

Da bei den meisten Testverfahren vorausgesetzt wird, dass die Daten normalverteilt sind, wird diese Voraussetzung zunächst mit dem von **Lilliefors modifizierten Kolmogorow-Smirnov-Test** geprüft.

Je nachdem, ob die Hypothese der Normalverteilung der Daten angenommen wird oder nicht, können parametrische Tests oder nicht-parametrische Tests (Rangtests) durchgeführt werden.

Im Ergebnisteil werden die Tests und die p-Werte genannt. Testentscheidungen mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,01 werden als signifikant bezeichnet, Werte kleiner als 0,01 als hochsignifikant.

Bei den Korrelationskoeffizienten wird die Hypothese getestet, ob die Koeffizienten gleich Null sind. Allerdings gelten erst Korrelationskoeffizienten ab 0,7 als bedeutend für einen Zusammenhang.

In dieser Arbeit wurden folgende Tests verwendet:

Test	Anwendung	Hypothese
t-Test für unabhängige Stichproben	Gruppenvergleiche (zwei Gruppen) bei normalverteilten Daten	Gleichheit der Mittelwerte in den Gruppen
Zusammenhangsmaß	Anwendung	Hypothese
Pearsonscher Korrelationskoeffizient	Messung der linearen Abhängigkeit von intervallskalierten Daten	Korrelationskoeffizient ist gleich Null (bei normalverteilten Daten)
Spearman'scher Korrelationskoeffizient	Messung der monotonen Abhängigkeit von wenigstens ordinalskalierten Daten	Korrelationskoeffizient ist gleich Null (bei nicht normalverteilten Daten)

Überprüfung von Zusammenhängen zwischen den Variablen

Zur Untersuchung über die Stärke des (linearen) Zusammenhangs bzw. von Jedesto-Hypothesen zwischen zwei oder mehr Variablen dient die Korrelationsanalyse, deren Kennzeichnungsmaßzahl der Korrelationskoeffizient r für gleichskalierte metrische oder ordinale Variablen ist. Bei den in dieser Arbeit zu untersuchenden Variablen, die metrisch skaliert und normverteilt sind, wurde der Korrelationskoeffizient nach **PEARSON** bestimmt. Er ist standardisiert und eine dimensionslose Größe, die Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann, wobei die Werte ± 1 einen perfekten linearen Zusammenhang anzeigen, wenn also hohe Werte der einen Variablen mit hohen (bei $r = +1$) bzw. mit niedrigen Werten ($r = -1$) der anderen Variablen einhergehen und alle Werte in einem Plot auf einer Geraden liegen. Haben jedoch die Werte zweier Variablen einen solchen Zusammenhang nicht, zeigt sich dies an einem Koeffizienten nahe Null. Bei den in dieser Arbeit zu untersuchenden Variablen, die metrisch skaliert und nicht normalverteilt sind, wurde der Rangkoeffizient nach **SPEARMAN** bestimmt. Er hat die gleichen Eigenschaften wie der Pearson'sche Korrelationskoeffizient, jedoch misst er nicht den linearen, sondern den monotonen Zusammenhang zweier Variablen (also je größer desto größer, resp. niedriger).

Der partielle Korrelationskoeffizient liefert eine Maßzahl für den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen, die den linearen Einfluss der Kontrollvariablen berücksichtigt. In beiden Variablen wird zunächst eine lineare

Regression bzgl. der Kontrollvariablen durchgeführt, anschließend werden die Residuen dieser Regressionsrechnung miteinander korreliert. Bezeichnet man den Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen X_i und X_j mit r_{ij} , so wird der partielle Korrelationskoeffizient Zwischen X_1 und X_2 bereinigt um den linearen Einfluss der Variablen X_3 , abgekürzt r_{12-3} folgendermaßen berechnet:

$$r_{12-3} = \frac{r_{12} - r_{13}r_{23}}{\sqrt{1 - r_{13}^2} \sqrt{1 - r_{23}^2}}$$

Die „eigentliche“ Korrelation zwischen X_1 und X_2 (r_{12}) wird ergo bereinigt um die Korrelation zwischen den Variablen X_1 und X_3 (r_{13}) und X_2 und X_3 (r_{23}). Der partielle Korrelationskoeffizient r_{12-3} wird sich in der Regel nur dann vom einfachen Korrelationskoeffizienten r_{12} unterscheiden, wenn die anderen Koeffizienten r_{13} und r_{23} groß sind. Interpretieren kann man den partiellen Korrelationskoeffizienten dann als „wahre Korrelation“ zwischen X_1 und X_2 , wenn der Einfluss von X_3 konstant gehalten wird, also keinen Einfluss mehr auf X_1 und X_2 hat.

Der Signifikanzwert für einen Korrelationskoeffizienten ist die Fehlerwahrscheinlichkeit des Ablehnens der Hypothese H_0 : „Der Korrelationskoeffizient ist gleich Null.“ Ist dieser Wert kleiner als eine vorgegebene Schranke (hier: $\alpha=0,05$), so kann davon ausgegangen werden, dass der Korrelationskoeffizient ungleich Null ist. Bei den Korrelationsrechnungen wird für die Koeffizienten ein Stern vergeben, wenn der Signifikanzwert zwischen 0,01 und 0,05 liegt, zwei Sterne werden vergeben, wenn der Wert kleiner 0,01 ist. Da dieser Test beim Pearson'schen Korrelationskoeffizienten die Normalverteilttheit der beteiligten Variablen voraussetzt, wurde bei Nichtvorliegen der Normalverteilung auf den Spearman'schen Korrelationskoeffizienten ausgewichen. In der Literatur werden Korrelationskoeffizienten ab dem Betrag von 0,7 oder größer als gute Korrelation bezeichnet. Korrelationen vom Betrag her kleiner als 0,3 gelten als schwach, wobei der Signifikanzwert stark vom Stichprobenumfang abhängt (28).

5. Ergebnisse

5.1. Einzelergebnisse

Es folgt zunächst die tabellarische Darstellung der erhobenen Parameter in Abhängigkeit von der Zeit, eine Beschreibung sowie eine graphische Darstellung der Markerverläufe.

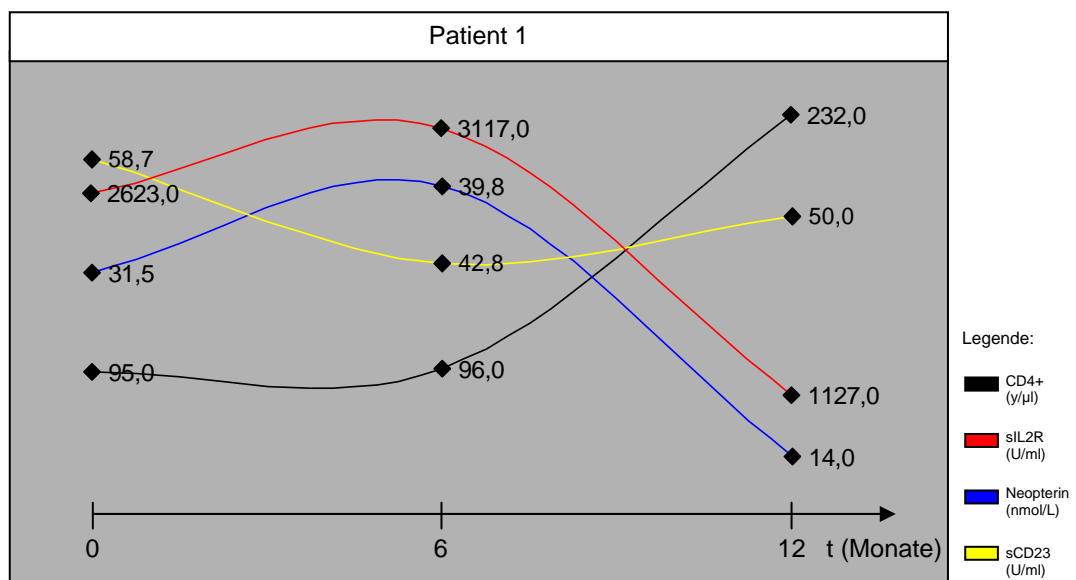
Patient 1

<i>Parameter/Zeitpunkt</i>	1	2	3
CD4+ (x/µl)	95	96	232
sIL2R (U/ml)	2623	3117	1127
Neopterin (nmol/l)	31,5	39,8	14,0
sCD23 (U/ml)	58,7	42,8	50,0

Hier fällt ein gleichsinniger Verlauf von sIL2R und Neopterin auf, beides Marker der TH1-Population, deren Konzentration mit Ausnahme des Wertes für Neopterin zum Zeitpunkt 3 durchweg erhöht sind, was als Ausdruck einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems angesehen werden kann. Weiterhin kommt es zu einer gegensinnigen Veränderung der Konzentration von sCD23, dem Marker der TH2-Population: steigen die Konzentrationen der TH1-Marker, so fällt die Konzentration des TH2-Markers. Weiterhin kommt es im zweiten Untersuchungsabschnitt zum Anstieg der T-Helferzellen.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass ein gleichsinniges Verhalten der TH1-Marker vorliegt, begleitet von einem gegensinnigen Verhalten des TH2-Markers. Der zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 zu beobachtende Anstieg der TH1-Marker mit Abfall der TH2-Marker ist nicht begleitet von einem signifikanten Anstieg der Gesamtkonzentration der CD4+Lymphozyten, wohl aber steigen diese im 2. Untersuchungszeitraum signifikant an bei gleichzeitigem Abfall der TH1-Marker mit konsekutivem Anstieg der TH2-Marker. Somit verhalten sich zwar die TH1- und TH2-Marker wie erwartet, jedoch ist der Verlauf der CD4+Lymphozyten im zweiten Untersuchungsabschnitt genau entgegengesetzt den Erwartungen. Allerdings ist genau dieser negative Zusammenhang zwischen der Konzentration der CD4+ T-Lymphozyten und sIL2R statistisch signifikant. Auffällig ist hier, dass die Spiegel der TH1-Marker nahezu durchgehend teils deutlich erhöht sind. Beide spiegeln - neben der TH1-Antwort - die Aktivierung des Immunsystems wider, wobei in diesem Fall bei

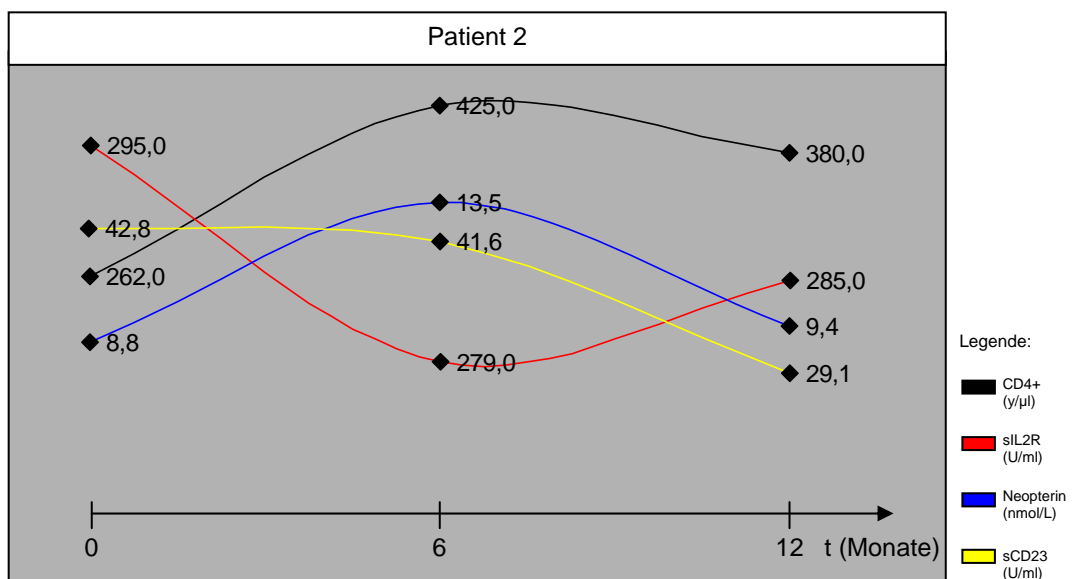
niedrigen Konzentrationen der T-Helferzellen besonders hohe Spiegel jener TH1-Parameter zu verzeichnen sind. Eine Modifikation der antiretroviralen Therapie war nicht erfolgt, allerdings war der seit 03/94 eingesetzten Therapie mit Azidothymidin (im Folgenden: AZT) Zalcitabin hinzugefügt worden, und zwar 6 Monate vor der ersten Blutentnahme. Eine Interpretation der Ergebnisse wäre dahingehend möglich, dass die Zytokine, bzw. deren Ersatzparameter, einer Rekonstitution der Helferzellzahlen vorauslaufen. Die initial gewählte antiretrovirale Therapie hat bei niedriger Konzentration der T-Helferzellen eine überwiegende TH1-Antwort erzeugt, die Eskalation der Medikation wurde wegen fallender Zellzahlen vorgenommen, nicht etwa wegen dem Auftreten opportunistischer Infektionen. Zeitverzögert kommt es dann auch zum Anstieg der T-Helferzellen bei deutlich fallenden Markern der TH1-Population, die wiederum auch die Aktivierung des Immunsystems widerspiegeln. Im Gegenzug sinkt der Aktivitätszustand des Immunsystems bei steigender T-Helferzellkonzentration. Interessant wäre hier gewesen, diesen Patienten weiter zu verfolgen, um insbesondere der Frage nachzugehen, ob im weiteren Verlauf trotz hoher Zellzahlen bei niedrigen TH1-Markern opportunistische Infektionen aufgetreten sind.



Patient 2

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/µl)	262	425	380
sIL2R (U/ml)	295	279	285
Neopterin (nmol/l)	8,8	13,5	9,4
sCD23 (U/ml)	42,8	41,6	29,1

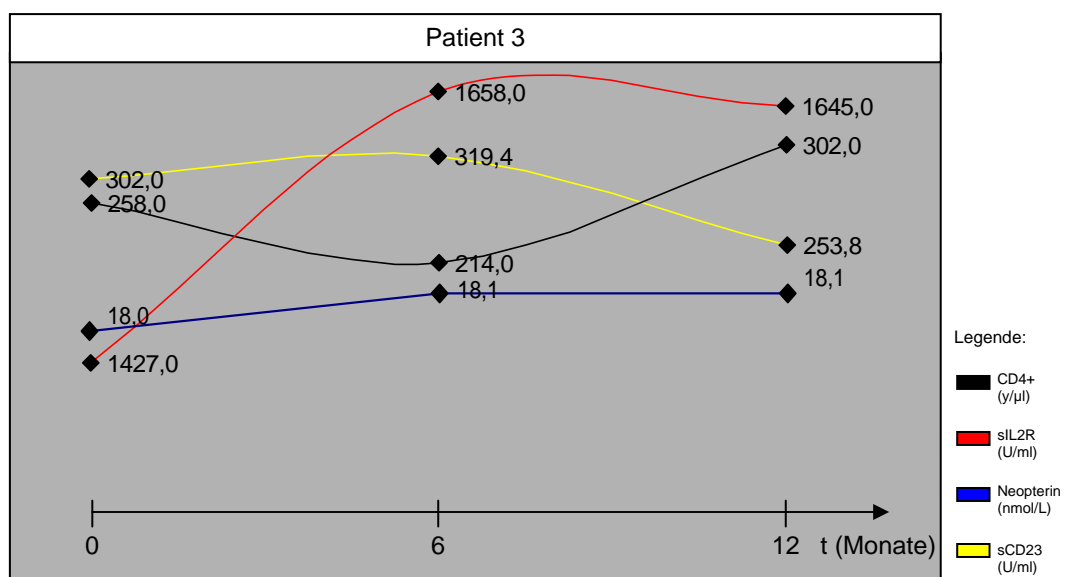
Hier ist kein gleichsinniger Verlauf von sIL2R und Neopterin zu beobachten, sondern das Gegenteil ist der Fall: beide Marker verhalten sich gegensinnig. Der leichte Anstieg von sIL2R im zweiten Untersuchungszeitraum ist nicht signifikant, somit sieht es in der graphischen Darstellung zwar so aus, als sei ein gegensinniges Verhalten zumindest von sCD23 und sIL2R zu beobachten, dies kann aber nicht bestätigt werden. Auffällig ist jedoch die positive Korrelation zwischen Neopterin und CD4+Lymphozyten: ein Anstieg dieses TH1-Markers geht mit einem Anstieg der T-Helferzellen einher, ebenso ist ein Abfall der Konzentration von Neopterin begleitet von einem Absinken der CD4+Lymphozyten. Sämtliche bestimmte Marker – mit Ausnahme der T-Helferzellen – befinden sich durchweg im Normbereich, ein Überwiegen der einen oder anderen Population lässt sich weder anhand der Markerverläufe noch an einer Erhöhung der Absolutwerte ablesen. Auffällig ist die durchweg recht hohe Konzentration von T-Helferzellen. Seinerzeit ergab sich anhand dieser Werte und fehlenden opportunistischen Infektionen keine Indikation zur antiretroviralen Therapie.



Patient 3

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/µl)	258	214	302
sIL2R (U/ml)	1427	1658	1645
Neopterin (nmol/l)	18,0	18,1	18,1
sCD23 (U/ml)	302,0	319,4	253,8

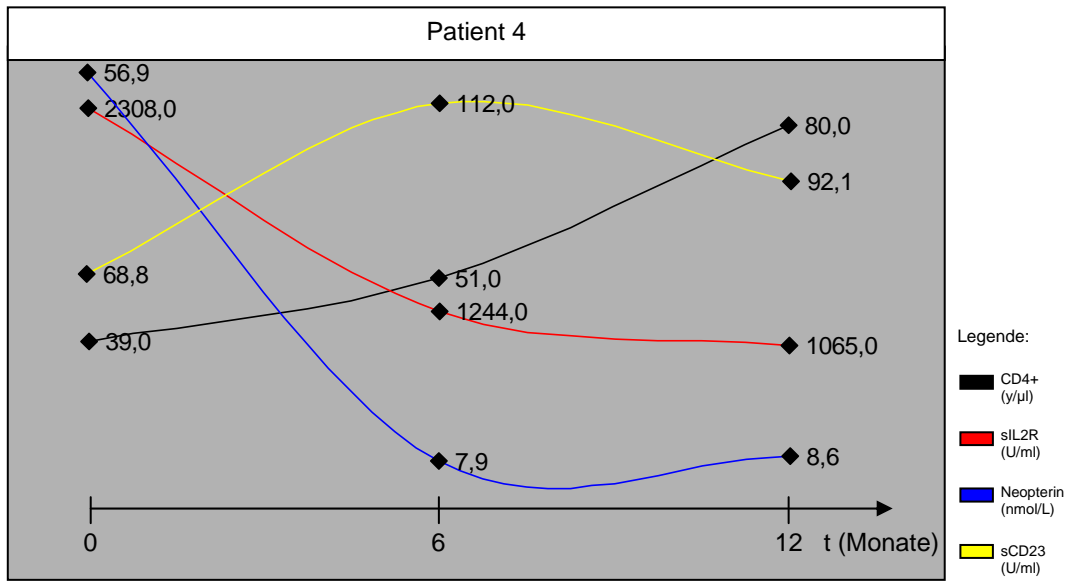
Auffällig ist hier, dass sämtliche Parameter – mit Ausnahme der T-Helferzellen – durchweg teils deutlich erhöht sind. Bei konstanten Werten des TH1-Markers Neopterin steigt die Konzentration von sIL2R deutlich an bei zunächst sinkender Konzentration der T-Helferzellen, die im weiteren Verlauf allerdings wieder ansteigen. Im Gegenzug steigt die Konzentration des TH2-Markers zunächst leicht an, um dann wieder deutlich abzusinken. 3 Monate vor der ersten Blutentnahme war eine ART mittels AZT wegen dem Auftreten einer opportunistischen Infektion begonnen worden. Zeitverzögert kommt es zum Anstieg der T-Helferzellen, verbunden mit dem Absinken des TH2-Markers und dem Anstieg des TH1-Markers sIL2R, wobei letzterer dem Anstieg der T-Helferzellen zeitlich vorausgeht. Neben der zahlenmässigen Erholung der T-Helferzellen scheint hier auch eine qualitative Immunrekonstitution im Sinne einer Zunahme von zumindest einem der TH1-Marker mit Rückgang des TH2-Markers vorzuliegen und zwar zeitlich vor dem Anstieg der T-Helferzellen, dem seinerzeit einzigen laborchemischen Verlaufsparemeter.



Patient 4

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/µl)	39	51	80
sIL2R (U/ml)	2308	1244	1065
Neopterin (nmol/l)	56,9	7,9	8,6
sCD23 (U/ml)	68,8	112,0	92,1

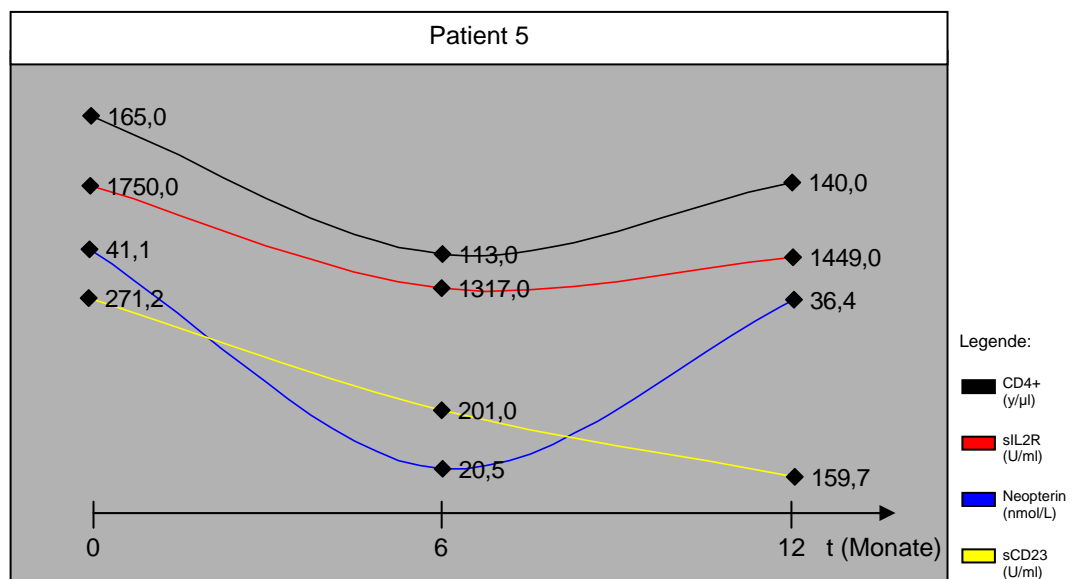
Hier fallen zunächst deutlich erniedrigte Werte für die T-Helferzellen auf. Die TH1-Marker sind zum ersten Untersuchungszeitpunkt deutlich erhöht und weisen im ersten Untersuchungsabschnitt ein gleichsinniges Verhalten auf, begleitet vom gegensinnigen Verlauf des TH2-Markers, der zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme noch normwertig ist. Während des zweiten Untersuchungsabschnittes ist das weitere Absinken der Konzentration von sIL2R von einem gleichsinnigen Verlauf von sCD23 begleitet, die Konzentration von Neopterin hingegen verändert sich nicht signifikant. Über beide Untersuchungszeiträume hinweg steigen die CD4+Lymphozyten an. Zumindest zum Zeitpunkt 1 scheint ein Überwiegen der TH1-Population vorzuliegen bei erheblich reduzierten T-Helferzellen. Der Patient erhielt durchgehend Didanosin, eine Modifikation der Therapie wurde nicht vorgenommen. Der Anstieg der T-Helferzellen könnte somit Ausdruck einer wirkungsvollen ART sein. 6 Wochen nach der zweiten Blutentnahme trat eine opportunistische Infektion in Form einer Soorösophagitis auf. Zu diesem Zeitpunkt waren interessanterweise die TH1-Marker bereits deutlich abgefallen, der TH2-Marker war über die Norm erhöht. Die Markerkonstellation zum ersten Untersuchungszeitpunkt deutet auf ein Überwiegen der TH1-Population hin, im Verlauf scheint jedoch der TH2-Subtyp an Bedeutung zu gewinnen. Dies könnte erklären, warum gerade zu besagtem Zeitpunkt eine opportunistische Infektion auftrat.



Patient 5

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/µl)	165	113	140
sIL2R (U/ml)	1750	1317	1449
Neopterin (nmol/l)	41,1	20,5	36,4
sCD23 (U/ml)	271,2	201,0	159,7

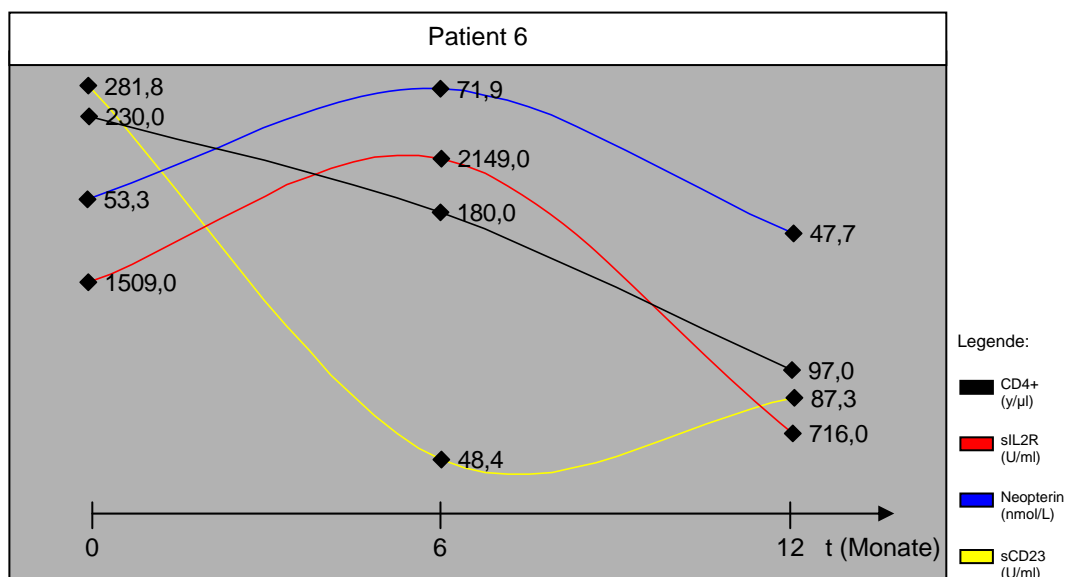
Ein gleichsinniges Verhalten der beiden TH1-Marker sIL2R und Neopterin ist über beide Untersuchungszeiträume zu beobachten, die Konzentration beider Marker ist durchweg erhöht. Die Konzentration von sCD23, die ebenfalls zu allen Zeitpunkten deutlich erhöht ist, sinkt von Untersuchung zu Untersuchung. Somit ist zumindest im zweiten Untersuchungsabschnitt die erwartete Gegensinnigkeit zu beobachten. Die sinkenden bzw. steigenden Werte der TH1-Marker wiederum sind begleitet von sinkenden bzw. steigenden Konzentrationen der T-Helferzellen. Im zweiten Untersuchungsabschnitt ist somit eine Konstellation zu beobachten, die die eingangs formulierten Erwartungen stützt: niedrige CD4+-Konzentrationen gehen einher mit sinkenden TH1-Markern und steigenden TH2-Markern. Der Patient wurde kontinuierlich mit AZT behandelt. Alle drei Marker sind zu allen Untersuchungszeitpunkten erhöht, tendenziell scheint jedoch die Aktivität der TH2-Population stetig rückläufig. Ob dies ein Effekt der ART ist, bleibt spekulativ.



Patient 6

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	230	180	97
sIL2R (U/ml)	1509	2149	716
Neopterin (nmol/l)	53,3	71,9	47,7
sCD23 (U/ml)	281,8	48,4	87,3

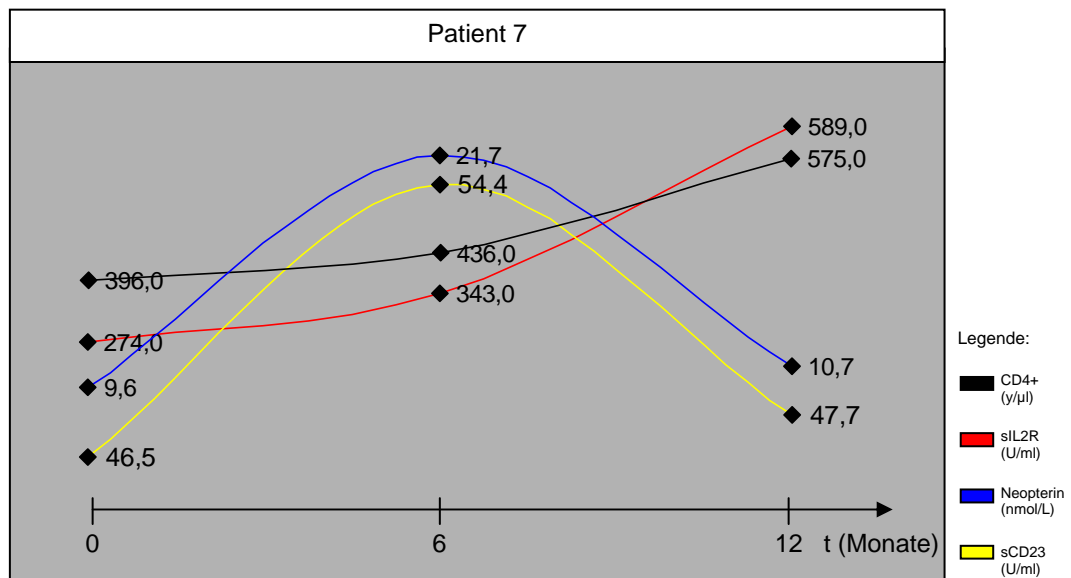
Hier lässt sich ein gleichsinniges Verhalten der TH1-Marker mit gegensinnigem Verhalten des TH2-Markers über beide Untersuchungszeiträume, begleitet von einem den Erwartungen entsprechenden Verlauf der Konzentration der CD4+Lymphozyten während des zweiten Untersuchungszeitraumes beobachten. Zwischen dem ersten und zweiten Untersuchungstermin fällt hingegen die Konzentration der T-Helferzellen bei steigenden TH1-Markern und fallenden TH2-Markern. Die antiretrovirale Medikation bestand aus AZT. Hier könnte den fallenden T-Helferzellen zunächst eine quantitative Immunrekonstitution gegenüberstehen: Eine steigende TH1-Aktivität ist begleitet von einem Absinken des TH2-Markers. Trotz sinkender T-Helferzellen kam es nicht zum Auftreten opportunistischer Infektionen. Während des zweiten Untersuchungsabschnittes fallen die TH1-Marker und der TH2-Marker steigt wieder an bei weiter fallenden T-Helferzellen. AZT scheint hier seine Wirkung verloren zu haben, nicht nur abzulesen an dem konsequenten Verlust der T-Helferzellen, sondern auch an der Trendwende der übrigen Parameter, die sich wieder in Richtung der Ausgangssituation entwickeln. Möglicherweise spiegelt der Markerverlauf im zweiten Untersuchungsabschnitt einen bevorstehenden TH1-TH2-Switch wider.



Patient 7

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	396	436	575
sIL2R (U/ml)	274	343	589
Neopterin (nmol/l)	9,6	21,7	10,7
sCD23 (U/ml)	46,5	54,4	47,7

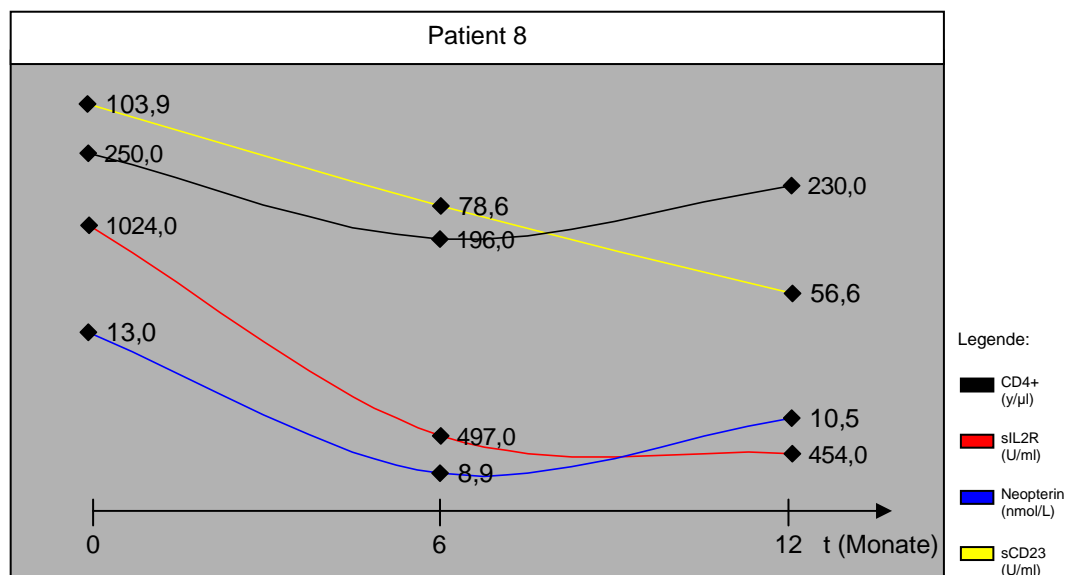
Bei diesem Patienten liegen noch recht hohe Werte für die T-Helferzellen vor. Es ist ein gegensinniger Verlauf der TH1-Marker über beide Untersuchungszeiträume zu verzeichnen. Dies widerspricht den Erwartungen, jedoch sind die Verläufe von sIL2R und sCD23 im zweiten Untersuchungsabschnitt ebenfalls gegensinnig und somit erwartungsgemäß. Ebenso kommt es in diesem Zeitraum zum Anstieg der T-Helferzellen, was wiederum der Annahme entspricht, dass ein fallender TH2-Marker und zumindest ein steigender TH1-Marker mit steigender Konzentration von CD4+Lymphozyten vergesellschaftet ist. Die antiretrovirale Medikation bestand durchgehend aus AZT.



Patient 8

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	250	196	230
sIL2R (U/ml)	1024	497	454
Neopterin (nmol/l)	13,0	8,9	10,5
sCD23 (U/ml)	103,9	78,6	56,6

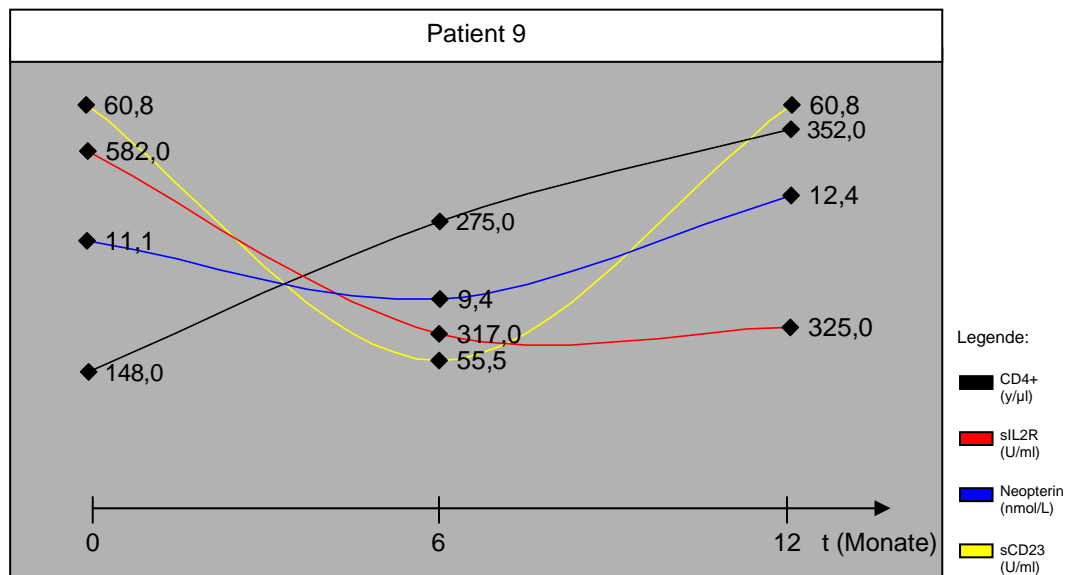
Hier verlaufen die Konzentrationsänderungen der TH1-Marker im ersten Untersuchungsabschnitt gleichsinnig, begleitet vom Absinken der CD4+-Konzentration, parallel sinkt jedoch die Konzentration des sCD23 ebenfalls. Im zweiten Untersuchungsabschnitt steigen die CD4+-Lymphozyten begleitet von einem Abfall des TH2-Markers, während sich die Konzentration der TH1-Marker nicht wesentlich verändert. Der Patient nahm durchgehend AZT ein. Hierunter sind die T-Helferzellen lediglich stabil, der TH2-Marker fällt, ebenfalls fällt der TH1-Marker sIL2R, der ebenso als Marker einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems aufgefasst werden kann. AZT scheint hier für den Patienten einen stabilen Profit zu erbringen, eine opportunistische Infektion trat nicht auf.



Patient 9

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	148	275	352
sIL2R (U/ml)	582	317	325
Neopterin (nmol/l)	11,1	9,4	12,4
sCD23 (U/ml)	60,8	55,5	60,8

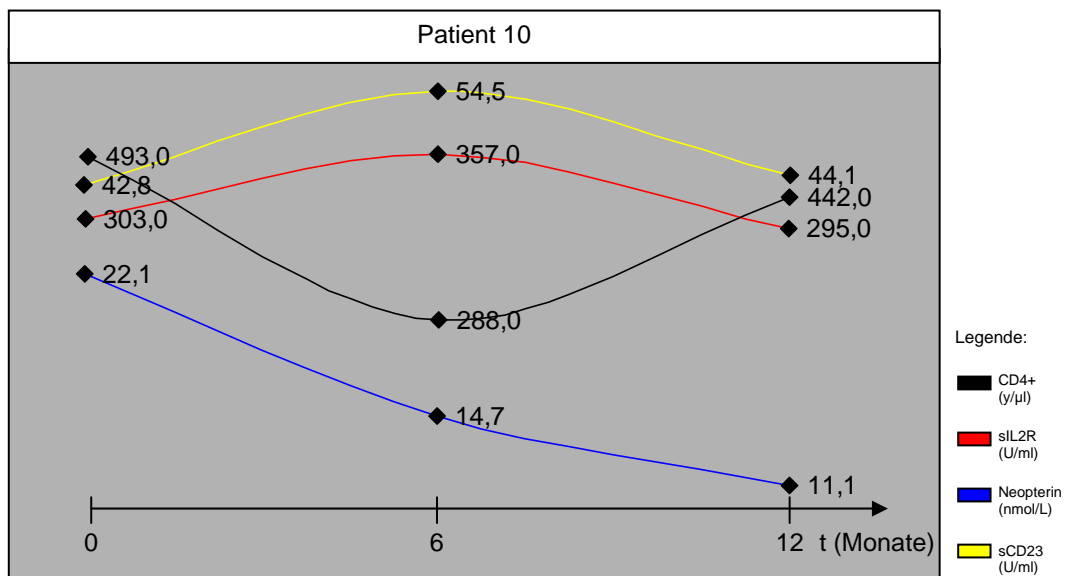
Bei diesem Patienten verlaufen die Konzentrationsänderungen aller drei Lymphozytensubpopulationsmarker gleichsinnig mit einem Abfall während des ersten und einem Anstieg während des zweiten Untersuchungszeitraumes, wobei die Konzentrationsänderungen von Neopterin in beiden Untersuchungsabschnitten nur marginaler Natur sind, sIL2R bleibt zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 konstant. Lediglich zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 ist der Anstieg des TH1-Marker begleitet vom Anstieg der T-Helferzellen. Sämtliche Marker befinden sich im Normbereich. Aufgrund der eingangs deutlich erniedrigten T-Helferzellen wurde eine antiretrovirale Therapie mittels AZT eingeleitet. Eine opportunistische Infektion trat nicht auf.



Patient 10

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/µl)	493	288	442
sIL2R (U/ml)	303	357	295
Neopterin (nmol/l)	22,1	14,7	11,1
sCD23 (U/ml)	42,8	54,5	44,1

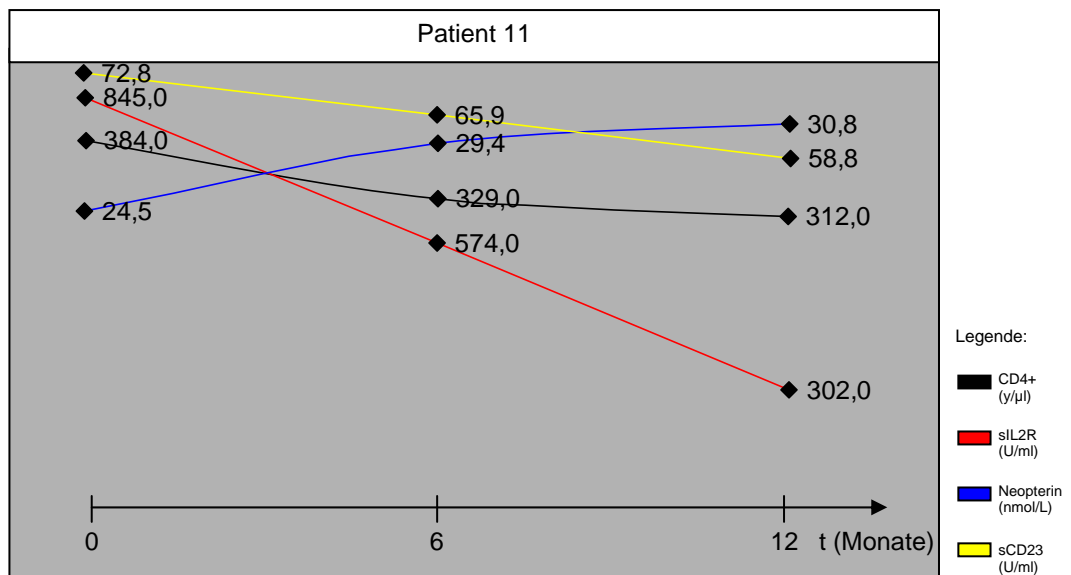
Bei recht hohen Konzentrationen der T-Helferzellen liegen alle gemessenen Marker im Normbereich, mit Ausnahme des ersten Wertes für Neopterin. Insgesamt liegt eine niedrige Aktivierung des Immunsystems vor, opportunistische Infekte waren weder vorausgegangen noch traten solche während der Untersuchung auf. Lediglich im ersten Untersuchungszeitraum steigt der TH2-Marker bei fallender Konzentration der T-Helferzellen, im Gegenzug sinkt die eingangs erhöhte Konzentration von Neopterin. Im zweiten Untersuchungsabschnitt fallen die Konzentrationen aller drei Zytokinmarker bei steigenden Helferzellen ab. Eine antiretrovirale Therapie bestand nicht. Möglicherweise spielen Zytokinveränderungen bei recht hohen Helferzellzahlen noch keine Rolle.



Patient 11

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	384	329	312
sIL2R (U/ml)	845	574	302
Neopterin (nmol/l)	24,5	29,4	30,8
sCD23 (U/ml)	72,8	65,9	58,8

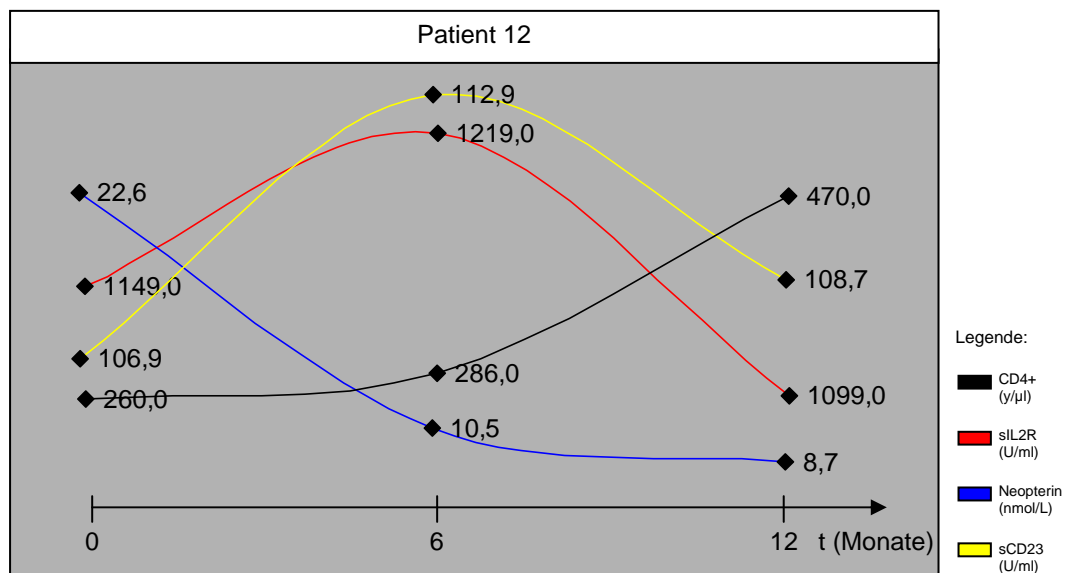
Auch dieser Patient hat zwar stetig fallende, insgesamt jedoch noch gut erhaltene T-Helferzellen. Einzig die Neopterinwerte sind durchweg erhöht. Der zweite TH1-Marker, sIL2R, ist normwertig, fällt aber kontinuierlich ab. Eine wesentliche TH2-Aktivität scheint ebenfalls nicht gegeben zu sein. Die antiretrovirale Medikation bestand aus AZT. Möglicherweise ist die erhöhte Aktivität des TH1-Markers Neopterin, dessen Konzentration im Verlauf noch ansteigt, bei normwertigem TH2-Marker Ausdruck einer AZT-induzierten qualitativen Immunrekonstruktion.



Patient 12

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	260	286	470
sIL2R (U/ml)	1149	1219	1099
Neopterin (nmol/l)	22,6	10,5	8,7
sCD23 (U/ml)	106,9	112,9	108,7

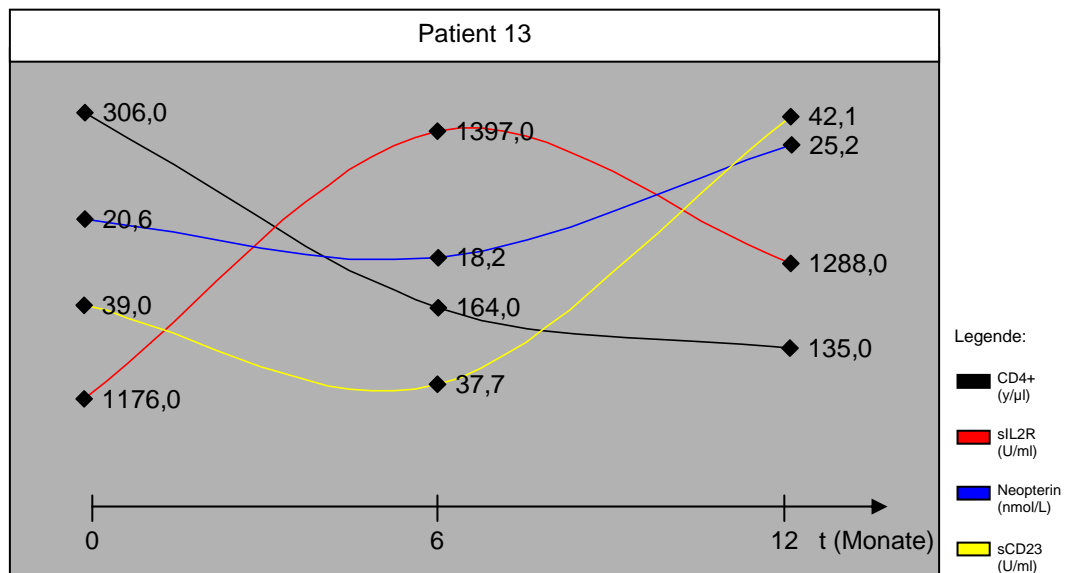
Wegen stetig fallender T-Helferzellen wurde bei diesem Patienten drei Monate nach der ersten Blutentnahme eine ART mittels AZT eingeleitet, im Gefolge steigen die T-Helferzellen deutlich an. Die TH1-Marker, ebenfalls Marker einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems fallen darauf hin ebenfalls ab, wobei der Abfall von Neopterin dem von sIL2R zeitlich vorausgeht, was den gegensinnigen Verlauf der TH1-Marker im ersten Untersuchungsabschnitt erklärt. Konsequenterweise ist allerdings der TH2-Marker sCD23, bei dem es zu keiner wesentlichen Konzentrationsänderung kommt. Bei steigenden Helferzellzahlen sind sowohl sIL2R als auch der TH2-Marker sCD23 erhöht, eine am Zytokinmuster ablesbare qualitative Immunrekonstitution scheint nicht einzutreten.



Patient 13

Parameter/Zeitpunkt	1	2	3
CD4+ (x/ μ l)	306	164	135
sIL2R (U/ml)	1176	1397	1288
Neopterin (nmol/l)	20,6	18,2	25,2
sCD23 (U/ml)	39,0	37,7	42,1

Die antiretrovirale Therapie dieses Patienten bestand durchgehend aus AZT und Zalcitabin, dennoch kommt es zum stetigen Abfall der T-Helferzellen. Dies muss man als virologisches Versagen betrachten, falls keine Noncompliance vorlag. Die TH1-Marker als Parameter der allgemeinen Aktivierung des Immunsystems sind konsequent erhöht, im zweiten Untersuchungsabschnitt kommt es zu einem leichten Anstieg des jedoch immer noch normwertigen TH2-Markers. Insgesamt scheint eine erhebliche Aktivierung des Immunsystems vorzuliegen mit Dominanz der TH1-Population. Ob der Anstieg von sCD23 und der Abfall von sIL2R Vorboten eines TH1/TH2-Switch sind, bleibt spekulativ. Eine opportunistische Infektion trat nicht auf.



5.4. Statistische Auswertung

Es lagen die Daten von vier Parametern, CD4+T-Lymphozyten/ μ l, sIL2R (U/ml), Neopterin (nmol/l) und sCD23 (U/ml), gemessen zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Monate, vor.

Über diese Variablen hinaus wurden die Differenzvariablen aller vier gemessenen Parameter zwischen den Zeitpunkten 2 und 1, resp. 3 und 2 generiert.

Alle beobachteten metrischen Variablen konnten mit dem Test von Kolmogorow-Smirnov auf einem 5%-Niveau als normalverteilt angenommen werden.

Zunächst wurde wegen der hohen Korrelation zwischen den Zeitpunkten der Mittelwert aller drei gemessenen Werte jedes Parameters errechnet.

Parameter	Zeitpunkte 1-2	Zeitpunkte 2-3
CD4+T-Lymphozyten	0,677*	0,840**
sIL2R	0,847*	0,648*
Neopterin	0,484*	0,754*
sCD23	0,726*	0,975*

Pearsonsche Korrelation der Parameter zwischen den Zeitpunkten:

* = signifikanter Korrelationswert auf 5%-Niveau

** = signifikanter Korrelationswert auf 1%-Niveau

Bezüglich der Frage, ob die Konzentration der CD4+T-Lymphozyten mit einem der anderen Parameter signifikant korreliert, ergaben sich folgende Werte:

Parameter (Mittelwert)	sIL2R	Neopterin	sCD23
CD4+T-Lymphozyten	-0,758**	-0,491	-0,292

** = signifikanter Korrelationswert auf 1%-Niveau

Signifikant ist demnach der negative Zusammenhang zwischen den Parametern sIL2R und CD4+ T-Lymphozyten: Je höher der eine, desto niedriger der andere Parameter. Ein ebenfalls negativer, aber auf dem 5%-Niveau knapp nicht signifikanter, Zusammenhang besteht zwischen den Parametern CD4+T-Lymphozyten und Neopterin.

Weiterhin wurde überprüft, ob zwischen dem Parameter sCD23 als Marker der TH2-Population und Neopterin und sIL2R als Marker der TH1-Population eine Korrelation besteht. Für diese Fragestellung wurden die entsprechenden Differenzvariablen korreliert:

Korrelation zur Differenz des sCD23	Zeitpunkte 1-2	Zeitpunkte 2-3
sIL2R	-0,477	-0,556*
Neopterin	-0,437	-0,592*

(Pearsonsche) Korrelationen der Differenzen zu den Zeitpunkten der Parameter untereinander

* = signifikanter Korrelationswert auf 5%-Niveau

Signifikante negative Korrelationen wurden nur zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 beobachtet.

Es trat lediglich eine opportunistische Infektionen auf, ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit einem der obigen Parameter war naturgemäss nicht gegeben.

6. Diskussion

Durch diese Untersuchung sollte überprüft werden, ob im Serum HIV-infizierter Patienten Marker nachweisbar sind, die es ermöglichen, den sog. TH1/TH2-Switch, also das (pathologische) Überwiegen der TH2-Lymphozytensubpopulation, zu detektieren. Morphologisch unterscheiden sich diese beiden T-Helferzellsubpopulationen nicht, wohl aber durch unterschiedliche Zytokinsekretion. Bislang waren Untersuchungen, die sich mit diesem TH1/TH2-Switch befassten, an Überständen von Lymphozytenkulturen asymptomatischer, HIV-infizierter Patienten durchgeführt worden (6), einem aufwendigen Verfahren, das für die Routinediagnostik nur mit Einschränkungen denkbar war. Da der Nachweis von Zytokinen im Serum durch teils sehr kurze Halbwertszeiten erschwert wird (3), wurden entsprechende Ersatzparameter, deren Konzentration mit der der interessierenden Zytokine gut korreliert (13, 14, 25, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41), ausgewählt und mittels ELISA-Technik bestimmt. Mittels dreier Bestimmungen über einen Zeitraum von einem Jahr wurde zunächst für jeden Patienten ein individuelles Markerprofil erstellt, anschließend erfolgte die statistische Auswertung.

Zu Beginn dieser Studie war die mittlerweile gut etablierte Methode der Viruslastbestimmung noch kein verfügbares Verfahren zur Aktivitätsbeurteilung der HIV-Infektion, bzw. zur Stellung der Indikation für den Beginn einer antiretroviralen Therapie. Die Frage, wann der beste Zeitpunkt für den Beginn einer solchen Therapie sei, wurde und wird immer wieder kontrovers diskutiert, wobei der Abfall der CD4+ Zellen unter einen kritischen Schwellenwert allein nicht als verlässlicher Parameter herangezogen werden kann, da individuell sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe auftreten, die sich bei annähernd gleicher Konzentration der T-Helferlymphozyten deutlich unterscheiden. Ein kritischer Schwellenwert, unterhalb dessen eine antiretrovirale Therapie zwingend indiziert ist und oberhalb dessen das Risiko für das Auftreten opportunistischer Infektionen so gering ist, dass man die damals raren zur Verfügung stehenden Medikamente für einen späteren Zeitpunkt hätte aufheben können, konnte auch bislang nicht sicher definiert werden. Die Idee dieser Studie war, mittels eines einfach zu gewinnenden Substrates, nämlich Serum, den TH1/TH2-Switch als ein möglicherweise kritisches Ereignis im Verlauf der HIV-Infektion zu detektieren und ggf. therapeutische Konsequenzen hieraus abzuleiten.

Nach wie vor ist unklar, ob der TH1/TH2-Shift bei allen HIV-infizierten Patienten vorkommt und somit ein regelmäßiges Ereignis im Gefolge einer HIV-Infektion darstellt oder ob nur einige wenige Patienten hiervon betroffen sind. Ebenfalls unklar sind die begünstigenden Faktoren, die eine solche Umverteilung zugunsten des TH2-Subtyps fördern oder initiieren und somit bleibt der Zeitpunkt, wann dies geschieht, ebenfalls im Ungewissen. Ein möglicher Risikofaktor für das Eintreten des TH1/TH2-Shifts könnte das Absinken der Konzentration der CD4+ T-Lymphozyten unter einen kritischen Schwellenwert darstellen. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte aber kein diesbezüglich signifikanter Nachweis geführt werden. Möglicherweise spielt die Dauer der Erkrankung eine entscheidende Rolle, jedoch war der genaue Zeitpunkt der Infektion nur den wenigsten teilnehmenden Patienten bekannt, so dass zu diesem, möglicherweise wichtigem Parameter, keine exakten Daten zu erheben waren. Ein weiterer Risikofaktor könnte das Auftreten opportunistischer Infektionen sein. Bedingt durch den starr vorgegebenen Rhythmus der Kontrolluntersuchungen, der keinen Bezug auf solche Ereignisse nahm, und die Tatsache, dass nur bei zwei Patienten im Laufe des Untersuchungszeitraumes ebensolche opportunistischen Infektionen auftraten, lässt auch hier keine gesicherte Aussage zu.

Insgesamt sind weitere Cofaktoren, wie zum Beispiel soziale Integration, fortgesetzter Alkohol- oder Drogenmissbrauch, Lebensführung und Coinfektion mit anderen, potentiell persistierenden Erregern wie Hepatitis B und C Viren denkbar.

Seinerzeit galt eine Reduktion der T-Helferzellen unter den Schwellenwert von 200/ μ l als kritisches Ereignis mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten opportunistischer Infektionen bzw. die Entwicklung AIDS definierender Malignome. Hier gilt es, die deutliche Streubreite von 50-500 CD4+T-Helferzellen/ μ l als Einschlusskriterium für die Teilnahme an dieser Studie als mögliche Ursache für die sehr unterschiedlichen, sich teils widersprechenden, Ergebnisse zu bedenken.

Ebenfalls von Bedeutung könnte die Art der Virusaquirierung sein, sexuell oder durch needle-sharing bzw. Transfusion. Auch diesbezüglich wiesen die eingeschlossenen Patienten keine Homogenität auf. Auch die Virulenz des jeweiligen Virusstammes mag Einfluss haben auf das Auftreten eines TH1/TH2-Shifts.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die erwarteten Markerkonstellationen – gleichsinniges Verhalten von sIL2R und Neopterin als Marker der TH1-Population, begleitet vom gegensinnigen Verlauf des TH2-Markers sCD23 sowie eine Korrelation mit der Konzentration der T-Helferzellen – in unterschiedlichem Maße eingetreten sind. Statistisch signifikant ist die negative Korrelation zwischen sIL2R und der Konzentration der T-Helferzellen. Bei hoher Konzentration der T-Helferzellen ist die Konzentration des TH1-Markers sIL2R folglich niedrig und umgekehrt. Da sIL2R auch als ein Marker einer allgemeinen Aktivierung des Immunsystems betrachtet werden kann, ist hieraus die Schlussfolgerung abzuleiten, dass diese Aktivierung um so schwächer ausfällt, je höher die Konzentration der T-Helferzellen ist. Die Erwartung, hohe Spiegel von TH1-Markern bei hohen T-Helferzellkonzentrationen als Ausdruck eines Überwiegens der TH1-Population vorzufinden, kann somit nicht bestätigt werden. Darüber hinaus besteht eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen sCD23 als Marker für die TH2-Population und sIL2R und Neopterin als Marker der TH1-Population, allerdings nur zwischen den Zeitpunkten 2 und 3. Dies wiederum entspricht der ursprünglichen Erwartung, dass fallende Konzentrationen der TH1-Marker vom Anstieg des TH2-Markers begleitet werden. Somit konnte ein Ergebnis erbracht werden, welches die Annahme stützt, dass der TH1/TH2-Switch im Serum HIV-infizierter Patienten nachweisbar ist.

In Anbetracht einer nur geringen Patientenzahl und eines willkürlich festgesetzten und zeitlich eng begrenzten Untersuchungszeitraumes scheint jedoch die Betrachtung des einzelnen Patienten ebenfalls wichtig und interessant, insbesondere deshalb, da es sich beim TH1/TH2-Switch um ein intraindividuelles Geschehen handelt, dessen Zeitpunkt unbekannt ist.

Betrachtet man beispielsweise die Markerverläufe von Patient 1, so stellen sich diese dahingehend entsprechend den Erwartungen dar, dass die Verläufe der TH1-Marker sIL2R und Neopterin sich gleichsinnig verhalten, der Verlauf des TH2-Markers sCD23 ist gegensinnig. Interessanterweise kommt es zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 zu einem Anstieg der TH1-Marker, im Gegenzug zum Konzentrationsabfall des TH2-Markers, also einem „umgekehrten“ Switch. Zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 sinken die Konzentrationen der TH1-Marker, die des TH2-Markers steigt. Möglicherweise kann an diesem Beispiel gezeigt werden, dass der TH1/TH2-Switch

nicht nur unidirektional möglich ist, sondern sogar umkehrbar. Unklar bleibt allerdings die Frage, welche Faktoren nötig waren, um dies herbeizuführen. Eine Änderung der antiretroviralen Medikation im Untersuchungszeitraum wurde nicht vorgenommen. Allerdings war der vorbestehenden Monotherapie mittels AZT 6 Monate vor Studienbeginn Zalcitabin hinzugefügt worden, und so könnten der Anstieg der T-Helferzellen und die veränderten Zytokinspiegel Ausdruck einer effektiveren virustatischen Therapie sein. Ähnlich verhält es sich mit Patient 6, auch hier scheint zweimal ein Switch vorzuliegen. Dieser Patient erhielt eine durchgehende AZT-Monotherapie.

Konkordante Verläufe zwischen den beiden TH1-Markern über beide Untersuchungszeiträume ohne gegensinniges Verhalten des TH2-Markers traten bei den Patienten 3, 5 und 9 auf. Über zumindest einen Untersuchungszeitraum war ein gleichsinniges Verhalten der TH1-Marker bei den Patienten 8, 10 und 12 zu beobachten.

Ein gleichsinniges Verhalten eines oder beider TH1-Marker und der Konzentration der CD4+Lymphozyten konnte bei etlichen Patienten beobachtet werden, ebenso ein gegensinniges Verhalten des TH2-Markers sCD23 im Bezug auf die T-Helferzellen. Hierbei ist jedoch lediglich ein negativer Zusammenhang zwischen sIL2R und CD4+Lymphozyten statistisch signifikant. Eine positive Korrelation zwischen Markern der TH1-Population und der Konzentration der T-Helferzellen bzw. eine negative Korrelation zwischen Markern der TH2-Population und der Konzentration der T-Helferzellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Abschliessend ist festzuhalten, dass bei zwei Patienten (1 und 6) anhand der Bestimmung der oben aufgeführten Serumzytokine und löslichen Rezeptoren Verläufe dokumentiert wurden, die nicht nur einem TH1/TH2-Switch entsprechen könnten, sondern diesen auch umkehrbar erscheinen lassen. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen des 8. Deutschen AIDS-Kongresses 2001 als Poster publiziert.

Zu Beginn dieser Untersuchung wurden etwa 150 HIV-positive Patienten in der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der JLU Gießen behandelt, von denen lediglich 27 die Einschlusskriterien erfüllten. 9 Patienten erklärten sich nicht zur Teilnahme

bereit bzw. war ihr Aufenthaltsort nicht ausfindig zu machen. Im Verlauf der Studie verstarben 2 Patienten, 3 erschienen nicht mehr zu den Kontrolluntersuchungen, so dass schliesslich nur die geringe Anzahl von 13 Patienten bis zum Abschluss der Untersuchung an der Studie teilnahmen.

Bedenkt man nun, dass trotz Eingrenzung und Selektion mittels der weiter oben aufgeführten Einschlusskriterien ein recht inhomogenes Patientengut mit unterschiedlicher Ausgangssituation, nicht nur bezogen auf die Konzentration der T-Helferzellen zum Untersuchungsbeginn, rekrutiert wurde, so ist die Tatsache, dass nicht alle Patienten in dieser Studie ein entsprechendes Markerprofil aufwiesen kein Beweis für das Nicht-Stattfinden entsprechender Veränderungen. Vielmehr ist aus dem Umstand, dass in einigen Fällen die zu erwartenden Verläufe tatsächlich zu dokumentieren waren sowie einer statistisch signifikanten negativen Korrelation zwischen den Markern der TH1- und TH2-Population die Vermutung abzuleiten, dass, bei kontinuierlicher und längerfristiger Beobachtung, bei weiteren Patienten entsprechende Veränderungen der Serumzytokine bzw. der hier verwendeten Ersatzparameter denkbar wären.

7. Literaturverzeichnis

1. **Klietmann W.** AIDS Forschung, Klinik, Praxis, soziokulturelle Aspekte; Schattauer Verlag, 1990
2. **Roitt Ivan M.** Leitfaden der Immunologie, Blackwell-Wissenschafts-Verlag, 1993
3. **Ibelgaufts H.** Dictionary of cytokines, VHC Verlagsgesellschaft mbh, 1995
4. **Daubenberger C.** Elemente des Immunsystems (IV): Interleukine, Start 2/94
5. **Fauci AS, Lane HC.** Erkrankungen durch humane Immundefekt-Viren; AIDS und verwandte Erkrankungen, in Harrisons Innere Medizin, McGraw-Hill, 14. Auflage, 1999
6. **Clerici M, Shearer GM.** A Th1/Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV-Infection, Immunology Today, 1993;14(3):107-110
7. **Romagnani S.** Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more, Immunology today, 1991;12(8):256-57
8. **Brodt H-R, Helm EB, Kamps BS.** AIDS 2000, Diagnostik und Therapie HIV-assoziierter Erkrankungen, Steinhäuser Verlag 2000
9. **Jäger H (Hrsg.).** HIV-Medizin: Möglichkeiten der individualisierten Therapie; wissenschaftliche Ergebnisse in der Mitte der 90er Jahre, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co KG, 1994
10. **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper t cell clone, The Journal of Immunology, 1986;136 (7):2348-57
11. **Lederer JA, Liou JS, Todd MD, Glimcher LH, Lichtman AH.** Regulation of cytokine gene expression in T helper cell subsets, Journal of Immunology, 1994;152:77-86
12. **Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O`Garra A.** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells, The Journal of Immunology, 1994;146(10):3444-3451
13. **Gordon J, Katira A, Strain AJ, Gillis S.** Inhibition of IL-4 promoted CD23 production in human B lymphocytes by transforming growth factor-beta, interferons or anti-CD19 antibody on engaging CD40, European Journal of Immunology, 1991;21:1917-22
14. **Gordon J, Flores-Romo L, Cairns JA, Millsum MJ, Lane PJ, Johnson GD, MacLennan ICM.** CD23: a multi-functional receptor/lymphokine ?, Immunology today, 1989;10(5):153-64

15. **Maggi E, Maccia D, Parronchi P, et al.** Reduced production of IL-2 and IFN-gamma and enhanced helper activity for IgG synthesis by cloned CD4+ T cells from patients with AIDS, *European Journal of Immunology*, 1987;17:1685-90
16. **Kariv I, Hardy RR, Hayakawa K.** Two distinct non-T helper type 2 IL-4+ cell subsets in mice as revealed by single-cell cytokine analysis, *European Journal of Immunology* 1994;24:549-557
17. **Mosmann TR.** Cytokine secretion phenotypes of Th cells: how many subsets, how many regulation? *Research in Immunology* 1991;142:9-13
18. **Swain SL.** Regulation of the development of distinct subsets of CD4+T cells, *Research in Immunology* 1991;142:14-18
19. **Gajewski TF, Fitch FW.** Differential activation of murine Th1 and Th2 clones, *Research in Immunology* 1991;142:19-23
20. **Williams ME, Chang TL, Burke SK, Lichtman AH, Abbas AK.** Activation of functionally distinct subsets of CD4+T-lymphocytes, *Research in Immunology* 1991;142:23-28
21. **Bretscher PA.** The regulatory functions of CD4+ and CD8+T-cell subsets in immune class regulation, *Research in Immunology* 1991;142:45-59
22. **de Vries JE., de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M-G, Spits H.** Do human Th1 and Th2 CD4+ clones exist? *Research in Immunology* 1991;142:59-63
23. **Clerici M, Hakim FT, Nenzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, Shearer GM.** Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic HIV-seropositive individuals, *The Journal of clinical investigation*, 1993;91:759-765
24. **Del Prete G, Maggi E, Pizzolo G, Romagnani S.** CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link, *Immunology Today*, 1995;16(2):76-80
25. **Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D.** Neopterin as a marker for immune system activation, *Current Drug Metabolism*, 2002;3(2):175-87
26. **Rubin LA, Nelson DL.** The soluble Interleukin-2 Receptor: Biology, Function and clinical application, *Annals of Internal Medicine*, 1990;113:619-627
27. **Fernandez-Botran R.** Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation, *FASEB Journal*, 1991;5(8):2567-2574
28. **Köhler W, et al.** *Biostatistik 2. Auflage*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996
29. **Niederwieser D, Huber C, Wachter H.** Neopterin, a new biochemical marker for the detection of activated T lymphocytes, *Wien Klin Wochenschr*, 1983; 95(5):161-4

30. **Woloszczuk W, Troppmair J, Leiter E, Flener R, Schwarz M, Kovarik J, Pohanka E, Margreiter R, Huber C.** Relationship of interferon-gamma and neopterin levels during stimulation with alloantigens in vivo and in vitro, *Transplantation*, 1986;41(6):716-9
31. **Fuchs D, Spira TJ, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Felmayer GW, Wachter H.** Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection, *Clin Chem*, 1989 A;35(8):1746-9
32. **Fuchs D, Banekovich M, Hausen A, Hutterer J, Reibnegger G, Werner ER, Gschnait FD, Dierich MP, Wachter H.** Neopterin estimation compared with the ratio of T-cell subpopulations in persons infected with human immunodeficiency virus-1, *Clin Chem*, 1988;34(12):2415-7
33. **Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H.** Immune response-associated production of neopterin: Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med*, 1984;160(1):310-6
34. **Henderson DC, Sheldon J, Riches P, Hobbs JR.** Cytokine induction of neopterin production, *Clin Exp Immunol*, 1991;83(3):479-82
35. **Daher S, Santos LM, Sole D, De Lima MG, Naspitz CK, Musatti CC.** Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 1995;5(5):251-4
36. **Kolb JP, Abadie A.** Inhibitors of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases suppress IL-4-induced CD23 expression and release by human B-lymphocytes., *Eur Cytokine Netw*, 1993;4(6):429-38
37. **Chomarat P, Briolay J, Banchereau J, Miossec P.** Increased production of soluble CD23 in rheumatoid arthritis and its regulation by interleukin-4. *Arthritis Rheum*, 1993;36(2):234-42
38. **Fischer A, Pfeil T, Konig W.** Cytokine control of peripheral-blood CD23 expression and sCD23 release: differential regulation by IL-2 and IL-4. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1990;92(4):334-42
39. **Pfeil T, Fischer A, Bujanowski-Weber J, Luther H, Altmeyer P, Konig W.** Effect of cytokines on spontaneous and allergen-induced CD23 expression, sCD23 release and Ig(E,G) synthesis from peripheral blood lymphocytes. *Immunology*, 1989;68(1):37-44

- 40. Klein J (Hrsg.).** Immunologie, Kapitel: 9 Lymphokine und ihre Rezeptoren, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991
- 41. Rubin LA, Nelson DL.** The soluble Interleukin-2 Receptor: Biology, Function and Clinical Application, *Annals of Internal Medicine*, 1990;113:619-627
- 42. Chattopadhyaya D, Baveja UK, Bose M, Kumar A.** Disease progression markers during asymptomatic phase of HIV infected children with unimpaired CD4+ cell values: *Journal of Tropical Pediatrics*, 48(6):340-7 2003
- 43. Barre-Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, Nugeyre M T, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rousioux C, Rozenbaum W, Montagnier L:** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 (1983), 868-71
- 44. Gallo R C, Sarin P S, Gelmann E P, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman V S, Mann D, Sidhu G D, Stahl R E, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M:** Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 (1983), 865-867.
- 45. Götz J, Mayr C, Heise W:** HIV und AIDS Praxis der Beratung und Behandlung. Urban und Fischer 1999
- 46. Concorde:** MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. *Lancet* 1994, 343:871-81

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden von 13 Patienten mit HIV-Infektion 3 Blutproben im Abstand von jeweils sechs Monaten gewonnen. Im daraus gewonnenen Serum wurden einige ausgewählte Parameter bestimmt, mit deren Hilfe eine Aussage über das Verhältnis von T-Helferzellen des Typs 1 zum Typ 2 ermöglicht werden sollte. Da sich diese beiden T-Helferzelltypen nicht morphologisch, sondern durch das Muster der sezernierten Zytokine unterscheiden, schien die Etablierung von Surrogatmarkern für den jeweiligen Subtyp sinnvoll.

Gemessen wurden die Serumkonzentrationen von Neopterin und löslichem Interleukin 2 Rezeptor als Marker der TH1-Population, löslichem CD23 als Marker der TH2 Population und CD4+ T-Lymphozyten.

Überprüft wurde die Frage, ob ein Anstieg der TH2 Marker von einem gegensinnigen Verhalten der TH1 Marker begleitet wird und umgekehrt und somit der TH1/TH2-Switch mittels Serumparametern zu detektieren ist. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob dieser Switch in Zusammenhang mit der Konzentration der CD4+ T-Lymphozyten steht.

Die Untersuchung erbrachte folgende Ergebnisse:

Statistisch signifikant war eine negative Korrelation zwischen sCD23 (TH2) und sIL2R und Neopterin (TH1) zwischen den Zeitpunkten 2 und 3.

Dies entspricht der Erwartung gegensinniger Verläufe der TH1- und TH2-Marker und kann somit als Indiz für das Stattfinden und die Nachweisbarkeit im Serum des TH1/TH2-Switch angesehen werden.

Ebenfalls statistisch signifikant ist die negative Korrelation zwischen der Konzentration der T-Helferzellen und sIL2R (TH1). Somit ist ein Absinken der T-Helferzellen vergesellschaftet mit einem Anstieg des TH1-Markers sIL2R.

Diese Daten wurden als Poster auf dem 8. Deutschen AIDS-Kongress 2001 in Berlin präsentiert: Mayer T., Teichmann J., Discher T., Stracke H., Lange U., Systemisch messbare Parameter zur Detektion des TH1/TH2-Shifts bei HIV-Infektion, Abstractband Crossing borders: 45.

9. Summary

T-helpercells can be divided into two distinct groups, TH1 and TH2, by analysis of the different patterns of cytokines produced by those groups. In HIV-infection a shift from dominant TH1 to more TH2-type was proved by using lymphocyte cultures and was considered to be a critical step in the progression to AIDS . We tried to prove this shift by using serum. Therefore, the serum of 13 Patients infected by HIV was analyzed every six months for three times. The serum levels of Neopterin and soluble Interleukin-2-Receptor (sIL2R), considered to be markers of TH1-type and soluble CD23 (sCD23), considered to be a marker of TH2-type were analyzed. We tried to find out, if increasing levels of TH1 markers were associated with the decrease of TH2 marker and vice versa and if increase or decrease of those markers were associated with increasing or decreasing T-helpercellcounts.

Significant results:

We found out, that there is a statistically significant negative correlation between sCD23 (TH2) and sIL2R and Neopterin (TH1) between second and third blood sample. This can be considered to be a proof for the detectability of TH1/TH2-Shift in the blood of HIV infected patients.

There is as well a statistically significant negative correlation between sIL2R (TH1) and T-helpercellcount.

These data were published in the poster session of The 8. German AIDS Congress in Berlin in 2001.

10. Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. med. U. Lange danke ich für die Überlassung des Themas, die Förderung und Betreuung meiner Arbeit, die ständige Gesprächsbereitschaft und seinen unermüdlichen Einsatz, der die Entstehung dieser Dissertation erst möglich machte.

Darüber hinaus danke ich ausserordentlich Herrn Dr. med. T. Discher für die Mithilfe bei der Planung und Konzeptionierung sowie die wiederholte Durchsicht des Manuskriptes. Ohne seine konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. J. Teichmann für viele Anregungen, die praktische Hilfe bei der Durchführung und ebenfalls kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau J. Sitte, die als MTA in der Medizinischen Poliklinik Gießen durch die tatkräftige Einarbeitung und Unterstützung bei der Tätigkeit im Labor maßgeblich zum Gelingen beigetragen hat.

Besonderer Dank gebührt Herrn Robert Brdaric für seine Zauberkünste am PC sowie Herrn Steffen Schwarz für die Korrektur im Sinne der neuen Rechtschreibung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen teilnehmenden Patienten, die mich und diese Arbeit unterstützt haben.