

Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Medizinischen Klinik I

Gastroenterologie / Infektiologie / Rheumatologie

Direktor: Prof. Dr. Martin Zeitz

Mukosale Zytokin-mRNA-Expression
bei HIV-Patienten im Verlauf einer
hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Hubert Schulbin
aus Tönning

Gutachter:

1.) Prof. Dr. M. Zeitz

2.) Prof. Dr. H. Zeichhardt

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 17.03.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die besondere Rolle der intestinalen Mukosa bei der HIV-Infektion	1
1.2. Zytokine	3
1.3. Zytokinexpression in der Mukosa während der HIV-Infektion	7
1.4. Zielsetzung	8
2. Material	9
2.1. Charakterisierung von Patienten und Kontrollpersonen	9
2.2. HIV-Beladung und CD4 ⁺ T-Zellzahl	10
2.2.1. HIV-Beladung im Blut und in der intestinalen Mukosa unter HAART	10
2.2.2. CD4 ⁺ T-Zellzahlen im Blut und in der intestinalen Mukosa unter HAART	11
2.3. Chemikalien und Reagenzien	11
2.4. Kits	12
2.5. Enzyme mit Puffern	14
2.6. Primer und Hybridisierungssonden	15
2.7. Zellen	16
2.8. Puffer und Stammlösungen	17
2.9. Kulturmedien	18
2.10. Geräte	19
2.11. Verbrauchsmaterialien	19
3. Methoden	20
3.1. RNA-Extraktion	20
3.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA	21
3.3. DNase-Verdauung	22
3.4. Reverse Transkription	23
3.5. Primerdesign	24
3.6. Amplifikation von cDNA mittels konventioneller PCR	25
3.7. Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese	27
3.8. Herstellung quantitativer Standardreihen für die Echtzeit-PCR	28
3.8.1. PCR-Produktreinigung	28
3.8.2. Klonierung, Transformation und Kultivierung	29
3.8.3. Plasmidextraktion	31
3.8.4. Restriktionsverdauung	32
3.8.5. Bestimmung der Konzentration des Plasmids im Eluat	34
3.8.6. Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter	35
3.8.7. Erstellung der Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl	35
3.9. Echtzeit-PCR mit dem LightCycler	36
3.9.1. Der LightCycler	36
3.9.2. SYBR Green	39
3.9.3. Spezifische Hybridisierungssonden	41
3.10. Statistische Auswertung	43
4. Ergebnisse	44
4.1. RNA-Isolierung	44
4.2. Wiederfindung	45
4.3. PCR-Etablierung	46
4.3.1. Methodische Nachweisgrenze	46
4.3.2. LightCycler-PCR: SYBR Green oder spezifische Hybridisierungssonden	47

4.3.3. Amplifikation der quantitativen Standardreihen am LightCycler	48
4.3.4. Detektion der PCR-Produkte am LightCycler	51
4.3.5. Mit Antikörpern geblockte Taq- versus herkömmliche Taq-Polymerase	54
4.3.6. Variation der LightCycler-Messungen bei verdünnten Proben von GAPDH	56
4.4. Veränderungen der mukosalen Zytokin-mRNA-Expression von HIV-infizierten Patienten unter HAART versus Kontrollpersonen	57
5. Diskussion	62
5.1. Diskussion der Methoden	62
5.2. Mukosale Zytokin-mRNA-Expression	65
Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	71
Danksagung	77
Erklärung an Eides Statt	78
Lebenslauf	79
Veröffentlichungen/Präsentationen	80
Klinische Studien	82

Danksagung

Ich danke meiner Mutter, die im Verlauf der Jahre lebenswerterweise nicht mehr nach dem Abgabetermin dieser Arbeit fragte und meinem Vater, der nur die ersten Jahre der Entstehung dieser Arbeit miterleben konnte und dann leider unerwartet verstorben ist.

Danken möchte ich meiner Freundin Dr. Susan Kamel, die uns eine wunderbare Tochter geschenkt hat und zur Geburt rücksichtsvollerweise noch nicht ihren Dokortitel besaß und meinem Freund Dr. Hartmut Stocker für seine liebe Hilfe. Großer Dank gebührt meinen Freunden deren Ermutigung für mich von nicht zu überschätzender Bedeutung war.

Herrn Prof. Dr. med. E. O. Riecken und Herrn Prof. Dr. med. M. Zeitz danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner Arbeit. Herrn Dr. med. Reiner Ullrich danke ich für die zuverlässige Betreuung sowie die ständige Ansprechbarkeit und Beratung bei der Durchführung der Experimente. Dr. rer. nat. Thomas Zippel danke ich für seine enorme Hilfsbereitschaft bei PCR- und Klonierungsproblemen und für zahlreiche Gespräche, die molekularbiologische Fragestellungen amüsant und anschaulich machten. Herrn Dr. rer. nat. Hagen Bode danke ich für die konstruktive Kritik bei der Korrektur des Manuskripts und die Ausdauer mir bei Softwareproblemen zur Seite zu stehen. Ulrike Dethlefs sei an dieser Stelle für die vielen theoretischen und praktischen Hinweise gedankt und für die offenen Ohren und den Humor, der den Laboralltag ungemein bereicherte. Die ausgesprochen freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre im gastroenterologischen Labor mit Magelie Gärtner, Sylvia Münchow, Frau Lottmann und Frau Brunn trug wesentlich zum Spaß am Promovieren bei. Herrn Olfert Landt von der Firma Tibmolbiol möchte ich für das persönliche Engagement und seine freundliche Art während der Entstehung dieser Arbeit herzlich danken.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzen Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 24.04.2005

Unterschrift: _____

Hubert Schulbin

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hubert Schulbin
 Geburtsdatum: 23.08.1971
 Geburtsort: Tönning (Schleswig-Holstein)
 Eltern: G. Zander und H. Schulbin

Schulbildung

Juni 1991 Abitur in Bad Segeberg, Durchschnittsnote: 2,2

Studium

Oktober 1992 - August 1994 Studium der Biologie an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Oktober 1994 – Februar 1997 Studium der Humanmedizin an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

August 1996 Ärztliche Vorprüfung: 2,3

seit März 1997 Studium der Humanmedizin an der
 Freien Universität Berlin

September 1997 1. Staatsexamen (2,0)

März 2000 2. Staatsexamen (2,0)

April-Juli 2000 PJ: Gastroenterologie und Infektiologie
 Prof. Dr. E. O. Riecken, UKBF, Berlin

August-September 2000 PJ: Chirurgie, Guys, King's & St Thomas
 School of Medicine, London, GB

- Oktober-November 2000 PJ: Chirurgie, Mount Sinai Hospital
School of Medicine, New York, USA
- Dezember-März 2001 PJ: Psychiatrie der Freien Universität Berlin
- Mai 2001 3. Staatsexamen (2,0)

Ärztliche Tätigkeiten

- November 2001 – April 2003 AIP im Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum,
Abteilung: Infektiologie/Gastroenterologie
- seit Juli 2003 Assistenzarzt im Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum,
Abteilung Infektiologie, Schwerpunkt: HIV

Veröffentlichungen/Präsentationen

- Juli 2003 **Racivir® Demonstrates Safty and Efficacy in a Phase Ib/IIa Study as a Component of HAART**
R.F. Schinazi, M.J. Otto, K. Arastéh, C. Herzmann, H. Schulbin, P. Kreckel, A. Beard, L. Cartee, S.J. Hurwitz, R.L. Murphy
Antiviral Therapy 2003; 8 (Suppl 1): 457 (2003).
- Mai 2003 Poster-Präsentationen auf dem 9. Deutschen und 14. Österreichischen AIDS-Kongress in Hamburg, Deutschland:
- a) **Analyse von protrahierten Verläufen cerebraler Toxoplasmose bei 26 HIV positiven Patienten**
H. Schulbin, A. Masuhr, K. Arastéh
- b) **Mukosale mRNA-Zytokinexpression von HIV-Patienten bei Initiierung und im Verlauf einer HAART**
H. Schulbin, H. Bode, K. Arastéh, M. Zeitz, R. Ullrich

- Februar 2003 Poster-Präsentation auf dem Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin in Berlin, Deutschland:
Mukosale mRNA-Zytokinexpression bei HIV-infizierten Patienten vor und 4 Monate unter HAART
H. Schulbin, H. Bode, T. Zippel, K. Arastéh, M. Zeitz, R. Ullrich.
Infection 2003; 31 (Suppl 1): 87 (2003).
- September 2002 Vortrag auf dem “33rd Annual Meeting of German Society of Immunology” in Marburg, Deutschland:
Effects of highly active antiretroviral therapy on the gut mucosal immune system in HIV-infected patients
H. Schulbin, T. Zippel, W. Schmidt, H. Bode, M. Zeitz, R. Ullrich.
Immunobiology, Volume 206 (1-3): 301-302 (2002).
- Juni 2002 Poster-Präsentation auf dem “11th International Congress Of Mucosal Immunology” in Orlando, USA:
Effects of HAART on the gut mucosal immune system in HIV-infected patients
H. Schulbin, T. Zippel, H. Bode, K. Arastéh, M. Zeitz, R. Ullrich.
Mucosal Immunology Update, Volume 10 (2,3): 3097 (2002).
- September 2001 Poster-Präsentation auf dem “32rd Annual Meeting of German Society of Immunology” in Dresden, Deutschland:
Cytokine mRNA expression remains elevated in the intestinal mucosa of HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy
H. Schulbin, T. Zippel, W. Schmidt, H. Bode, M. Zeitz, R. Ullrich.
Immunobiology, Volume 204 (1-2): 255-256 (2001).
- July 2001 Vortrag auf dem 8.Deutschen AIDS-Kongress, Berlin, Deutschland:
Analyse des mukosalen Zytokinexpresionsmusters bei HIV Patienten unter HAART
H. Schulbin, T. Zippel, W. Schmidt, H. Bode, M. Zeitz, R. Ullrich.
Eur J Med Res 6 (Suppl I): 34-35 (2001).

Klinische Studien

Verantwortlich für die Koordination und tätig als Untersucher (sub-investigator) der folgenden klinischen Studien:

- A phase III, randomised, open-label, parallel, multicenter study to evaluate treatment with fixed-dose combination of Abacavir/Lamivudine (600 mg/300 mg) once-daily versus Abacavir 300 mg twice-daily and Lamivudine (300 mg) once-daily in combination with Tenofovir once daily and a new PI or NNRTI for 48 weeks in ART-experienced HIV-1 infected patients (CAL30001).
- A phase II dose escalating study exploring the safety, tolerability, pharmacokinetics and virological effect of Racivir TM(RCV) after 14 days of oral ascending doses of 200, 400 and 600 mg RCV in combination with efavirenz and stavudine in HIV-1 infected men (CI-PSI-004-02-101).
- A phase III open label, randomised, active, controlled study assessing the efficacy and safety of T20 (HIV-1 fusions inhibitor) in combination with an optimised background regime, versus optimised background regime without T20, in patients with prior experience and/or prior documented resistance to each of the three classes of approved antiretrovirals (T20-302/BV16052).
- A phase IIa open-label multinational study of the effects of three dose pairs of Tipranavir/Ritonavir (b.i.d.) on the pharmacokinetic characteristics of protocol-defined baseline, triple drug nucleoside and none-nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy in HIV-1 infected subjects (Trial No. 1182.6).
- Investigation of pharmacokinetic interaction of Nevirapine and methadone in HIV-1 infected patients in combination with various NRTIs (1100.1359).