

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

Die bisher publizierten Daten zur Zytokinexpression lassen sich aufgrund der Unterschiede der angewandten Methoden und Versuchsanordnungen selten direkt vergleichen. So existieren Ergebnisse zur Freisetzung bestimmter Zytokine aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien wie Serum, aufgereinigten Zellen, Zellkulturüberständen, homogenisierten Geweben und aus deren Kulturüberständen. Die Aussagen über die Menge und die Aktivität der freigesetzten Zytokine wurden mit zahlreichen unterschiedlichen Techniken ermittelt: Auf Proteinebene durch Immunhistochemie, FACS oder Western Blot und auf mRNA-Ebene durch In-situ-Hybridisierung, Northern Blot, quantitativ-kompetitive oder quantitative Echtzeit-PCR. All diese Methoden besitzen oft nur begrenzten Informationswert für den Gesamtzusammenhang. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der RT-Echtzeit-PCR im LightCycler von Roche mit spezifisch hergestellten Detektionssonden stellt zur Zeit die sensitivste Technik dar, um quantitative Aussagen zu Zytokinen auf mRNA-Ebene zu erhalten. In der extremen Sensitivität der PCR liegt auch ihr Nachteil, weil sich geringste Veränderungen in den Ausgangsbedingungen exponentiell vergrößern (Jung et al., 1997). So stellen Kontaminationen bei der PCR eine der Hauptursachen für falsch-positive PCR-Ergebnisse dar. Das Problem hierfür liegt nicht generell bei der Isolation und Aufarbeitung der RNA/DNA, sondern vielmehr in der weiteren Analyse von PCR Produkten zum Beispiel bei der Gelelektrophorese. Werden nach einer PCR die amplifizierten Matrizen auf ein Gel aufgetragen, ist die Gefahr der Verschleppung von Kopien sehr hoch, da 0,1 µl PCR-Amplifikat ca. 10^9 Kopien enthält (Kwok and Higuchi, 1989). Diese Gefahr wird durch die Echtzeit-PCR im „closed tube format“ verringert, da eine weitere Bearbeitung der Proben nach dem Ende der PCR überflüssig ist. Hierdurch wird zusätzlich ein Zeitvorteil bei der Probenanalyse erreicht. Auch die Verwendung von Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion der Banden bei der Gelelektrophorese wird bei dieser Technik nicht benötigt, wodurch der Kontakt mit einer kanzerogenen Substanz entfällt. Kontaminationen sind jedoch nicht nur durch PCR-Produkte, sondern auch durch genomische DNA möglich. Um diese Gefahr zu minimieren, wurde bei allen extrahierten RNA-Proben eine DNase-Verdauung durchgeführt. Ferner wurde das methodische Vorgehen kontrolliert, indem für jedes Zytokin geprüft wurde, ob sich aus nicht-umgeschriebenen RNA-Proben in der PCR nach DNA-Verdauung noch Kopien amplifizieren ließen. Diese als „minus-RT-Kontrollen“ bezeichneten Kontrollen zeigten keine Amplifikation. Daher ist davon auszugehen, dass in den Proben keine Kontamination mit genomischer DNA

vorgelegen hat. Durch den Einsatz von minus-RT-Kontrollen wurde auch das methodische Problem der hypothetischen Amplifikation von Pseudogenen berücksichtigt. Bei Pseudogenen handelt es sich um hintereinandergeschaltete Exons der entsprechenden echten Gene, die an einem anderen Genlocus liegen und normalerweise nicht transkribiert werden. Sie sind vermutlich aus revers-transkribierter mRNA entstanden. Für GAPDH und beta-Actin wurden 25 beziehungsweise 20 Pseudogene beschrieben (Knippers, 2001). In dieser Arbeit wurde das Housekeeping-Gen GAPDH gewählt, weil bei den wenigen Veröffentlichungen zu Zytokineveränderungen bei HIV-infizierten Patienten ebenfalls GAPDH eingesetzt worden war und die Ergebnisse auch mit Blick auf diese Arbeiten diskutiert werden sollten. Außerdem wurde GAPDH für den Echtzeit-PCR-Nachweis in Darmbiopsien als geeignet beurteilt (Vandesompele et al., 2002). Da bei den minus-RT-Kontrollen weder bei den Zytokinen noch beim Housekeeping-Gen Amplifikate detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass keine Pseudogene amplifiziert wurden, sondern das gesamte PCR-Produkt aus der gewünschten Zielsequenz der Ursprungs-mRNA bestand.

Die Aussagekraft der konventionellen kompetitiven RT-PCR wird durch die Schwierigkeit der Quantifizierung limitiert (Bustin et al., 1999). Durch die Entwicklung der Echtzeit-PCR wird die Fluoreszenz von Sonden, die an das Amplifikat binden, kontinuierlich während der Vervielfältigung gemessen. Durch Angabe der absoluten Kopienzahlen der Standard-Transkripte errechnet die LightCycler Software die absolute m-RNA-Menge der zu untersuchenden Proben. Diese Art der Quantifizierung ist der konventionellen, kompetitiven PCR deutlich überlegen. Ein weiterer Vorteil der quantitativen Echtzeit RT-PCR am LightCycler mit fluoreszenzmarkierten Sonden ist die zusätzliche Spezifität dieser PCR-Methode durch die targetspezifische Sondensequenz, die sicherstellt, dass die gemessene Fluoreszenz nicht von anderen Sequenzen stammt. All diesen Vorteilen in der Anwendung und Aussagekraft der Echtzeit-PCR steht allerdings ihre aufwendigere Etablierung gegenüber, die mehr Arbeitsschritte erfordert und kostenintensiver ist als die Etablierung einer konventionellen quantitativen PCR. Die beiden Sonden im Reaktionsansatz sind kostenintensiv und obwohl sie von einer von Roche lizenzierten Firma passend zu den Primern konzipiert werden, muss ihr Funktionieren dennoch bei der Etablierung ausgetestet werden. Möglich wäre statt der Verwendung der spezifischen Sonden, auch der Einsatz von SYBR Green, einem Fluoreszenzfarbstoff der ähnlich wie Ethidiumbromid mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Als Nachteile von SYBR Green sind zu nennen, dass Primerdimere und unspezifische DNA-Amplifikate die Intensität des Fluoreszenzsignals erhöhen und die Quantifizierung somit verfälschen. Um dieses Problem der SYBR Green Anwendung abzuschätzen, wird nach jedem abgeschlossenem PCR-Lauf das doppelsträngige Produkt ein

weiteres Mal erhitzt und aufgeschmolzen. Anhand der Schmelzkurvenanalyse kann auf unerwünschte PCR-Produkte rückgeschlossen werden. Allerdings ist dieses Vorgehen erheblich ungenauer als die Verwendung spezifischer Sonden. Dies war der Grund, warum in dieser Arbeit spezifische Sonden verwendet wurden. Weiterhin entstehen für die speziellen PCR-Cycler hohe Anschaffungskosten von derzeit mehr als 50.000 Euro. Letztlich müssen quantitative Standards für die absolute Bestimmung der Transkriptzahl hergestellt werden und bei jeder PCR mitanalysiert werden. Dafür muss für jedes Zytokin eine Klonierung durchgeführt werden, wenn man sich wie wir gegen die PCR zur Herstellung der Standards entscheidet um fehlerhafte Zielsequenzen in den Standards zu vermeiden. Die Vermehrung des Standard-Targets in *E. coli* mit nachfolgender Kontrollsequenzierung bot die Möglichkeit größtmöglicher Sequenzgenauigkeit in den Standards.

Der LightCycler läßt die Analyse von 32 Proben zu. Zehn Plätze werden für die mitlaufenden Plasmid-Standards und die Negativkontrollen benötigt, so dass 22 Positionen zur Messung von elf Proben in Doppelbestimmung bereitstehen. Als methodischer Verbesserungsvorschlag wäre die Etablierung einer Multiplex-RT-PCR grundsätzlich denkbar, bei welcher zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen in einem Gefäß ablaufen und durch die Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen unterschiedliche Ziel-DNA-Produkte in einem Reaktionsgefäß detektiert werden können. Für die Multiplex RT-PCR eignet sich der LightCycler in besonderer Weise, da bis zu drei verschiedene Wellenlängen von drei verschiedenen Sonden gleichzeitig detektiert werden können, was mich auch bewogen hatte, die Sonden des Housekeeping-Gens GAPDH bei einer anderen Wellenlänge zu detektieren als die der Zytokine. Vorversuche zur Etablierung einer Multiplex-PCR zeigten aber eine geringere Effektivität und Sensitivität im Vergleich zu den PCRs, bei denen pro Reaktionsgefäß nur ein mRNA-Nachweis durchgeführt wurde. Aufgrund der vermuteten Interaktionen der unterschiedlichen PCR-Ansätze wurde die Multiplex-Methode nicht weiter verfolgt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden erlaubten erstmals die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression für verschiedene Zytokine im Verhältnis zum Housekeeping-Gen GAPDH aus einer Dickdarmbiopsie. Die etablierte Methode erreicht die theoretisch mögliche Nachweisgrenze von einer Kopie pro PCR-Ansatz, was circa 60 mRNA-Kopien in der Ausgangsbiopsie entspricht.

Die Proben zeigten das zu erwartende 2:1 Verhältnis von ribosomaler 28S- zu 18S-RNA, welches als ein guter Indikator für die Intaktheit der isolierten RNA zu werten ist. Die verwendete Trizol-Standard-Methode zeigte in einer vergleichenden Studie die höchste RNA-Ausbeute (Scheibner et al., 2000). Die mittlere RNA-Wiederfindungsrate von 98%, sowie die

Ausbeute an Gesamt-RNA pro mg Gewebe lagen im erwarteten Bereich (Anton et al., 2001; Invitrogen, 1997). Die photometrisch ermittelten Werte zur RNA-Reinheit belegen die gute Qualität der RNA Aufreinigungsmethode (Kampik et al., 2000).

Durch SYBR Green wird nicht eine spezifische Zielsequenz detektiert, sondern unspezifisch alle doppelsträngige DNA. Bei den geringen eingesetzten cDNA-Mengen stellten hierbei Primerdimere ein Problem für die quantitativen Untersuchungen dar, weswegen der Nachweis mittels spezifischer Hybridisierungssonden geführt wurde.

Die Verwendung der mit hitzesensiblen Antikörpern geblockten Taq-Polymerase ermöglichte auch bei großen PCR-Ansätzen einen definierten Reaktionsbeginn und zeigte im Vergleich zur herkömmlichen Taq-Polymerase eine deutlich bessere Empfindlichkeit. Von besonderer Bedeutung für die Sensitivität waren die Verwendung von spezifischen Hybridisierungssonden und der Einsatz Antikörper-geblockter Taq-Polymerase, welches eine Sensitivitätssteigerung um jeweils 1-log-Stufe ermöglichte.

5.2. Mukosale Zytokin-mRNA-Expression

Um den Einfluss einer HAART auf HIV-relevante Zytokine zu erforschen, wurden in dieser Arbeit zehn HAART-naive Patienten zu Beginn und im Verlauf von neun Monaten HAART untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Echtzeit-RT-PCR zur Messung der mRNA-Expression von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-16, IFN- γ , TNF- α , CCL3 und CCL5 etabliert. Diese Arbeit stellt die Echtzeit-RT-PCR mit spezifischen Hybridisierungssonden zur Quantifizierung der mRNA-Expression der genannten Zytokine aus Darmbiopsien vor.

Im Gegensatz zu früheren qualitativen bzw. semiquantitativen Untersuchungen der mukosalen Zytokinexpression mittels in-situ Hybridisierung (Reka et al., 1994) oder konventioneller RT-PCR (McGowan et al., 1994) waren in der großen Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Biopsien spezifische mRNA der genannten Zytokine nachweisbar, so dass quantitative Veränderungen bei der HIV-Infektion erfasst werden konnten. Im Vergleich zu Kontrollpersonen zeigten HAART-naive Patienten eine erhöhte mukosale mRNA-Expression für IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , CCL3 und CCL5, keine Unterschiede ergaben sich für IL-2 und IL-16. Diese Befunde zeigen eine erhöhte Aktivierung im mukosalen Immunsystem bei der HIV-Infektion, die allerdings keinem etablierten Th1- bzw. Th2-Muster entspricht (Reka et al., 1994).

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob die hohe HIV-Produktion in der Mukosa bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten (Kotler et al., 1991; Pantaleo et al., 1991; Smith et al., 1994) Ursache oder Folge der gesteigerten Immunaktivierung ist. Nach Einleitung einer

HAART kam es bei allen untersuchten Patienten zu einem schnellen Anstieg der mukosalen CD4⁺T-Zellzahl und einem deutlichen Abfall der mukosalen Viruslast unter die Nachweisgrenze, dennoch zeigte sich für HIV-infizierte Patienten im Vergleich zu Kontrollen weiterhin eine erhöhte mukosale mRNA-Expression für IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , CCL3 und CCL5. Diese trotz effektiver Inhibition der Virusvermehrung gesteigerte Aktivierung des mukosalen Immunsystems spricht gegen eine entscheidende ursächliche Rolle der Virusreplikation oder viraler Antigene für die mukosale Immunaktivierung. Tatsächlich wurde in Rektumbiopsien auch von unbehandelten HIV-infizierten Patienten keine Abhängigkeit der TNF- α - und IL1- β -Produktion von der mukosalen Provirus- oder Virusbeladung gefunden (Di Stefano et al., 2001).

Die hohe Virusreplikation in der intestinalen Mukosa bei unbehandelten Patienten ist daher eher Folge der gesteigerten Immunaktivierung, ein Effekt, der gerade für die hoch exprimierten inflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-6 plausibel erscheint, da diese die HIV-Replikation auch *in vitro* stimulieren (Kedzierska und Crowe, 2001). Andererseits fanden wir in Übereinstimmung mit früheren immunhistochemischen Befunden (Olsson et al., 2000) eine erhöhte Expression von mRNA für die β -Chemokine CCL3 und CCL5, denen eine HIV-supprimierende Wirkung zugeschrieben wird (Cocchi et al., 1995; Cohen et al., 1997; Gong et al., 1998). Diese Chemokine wirken allerdings chemotaktisch auf CD4⁺T-Zellen, und die hohe Expression von CCL3 und CCL5 in Verbindung mit einer hohen HIV-Produktion bei unbehandelten Patienten deutet darauf hin, dass mögliche HIV-supprimierende Effekte dieser Zytokine durch die Rekrutierung und Aktivierung potentieller Zielzellen in der Mukosa aufgehoben werden. Ihre anhaltend hohe Expression unter HAART könnte weiterhin die schnelle und überschüssende Repopulation des Dickdarms mit CD4⁺T-Zellen verursachen.

HIV-infizierte T-Zellen und Makrophagen sezernieren inflammatorische Zytokine, die die epitheliale Barriere schädigen können (Schulzke and Riecken, 1989). Auch nach Elimination des auslösenden Antigens durch HAART könnte eine solche durch HIV induzierte Barrierestörung über vermehrten Einstrom luminaler Antigene eine mukosale Entzündung aufrechterhalten (Stockmann et al., 2000). Dieser Mechanismus könnte nicht nur den geringen Einfluss der HAART auf die mRNA-Expression mukosaler Zytokine erklären, sondern auch dazu beitragen, dass bei geringerer Aktivierung chemotaktischer Zytokine durch luminale Antigene im intakten Dünndarm die Repopulation mit CD4⁺T-Zellen trotz HAART deutlich langsamer stattfindet als im Dickdarm (Miao et al., 2002). Untersuchungen zur Zytokinexpression im Dünndarm liegen bisher allerdings nicht vor. Außerdem ist bei diesen Überlegungen zu berücksichtigen, dass die

Zytokinbestimmung in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene durchgeführt wurde, da aufgrund der limitierten Gewebemenge keine Proteinbestimmungen möglich waren. Die Zytokinproduktion kann vielfältig auch posttranskriptionell reguliert werden, daher kann von der Menge an mRNA-Kopien nicht unmittelbar auf die sezernierte Menge des Zytokins geschlossen werden; dennoch erscheint es auch in Abwesenheit eines linearen Zusammenhangs sinnvoll anzunehmen, dass eine höhere Transkription auch zu höherer Sekretion führt.

Auffallend ist die hohe Variabilität der Zytokinexpression bei HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu den HIV-negativen Kontrollpersonen. Die Zuverlässigkeit von Messungen, die an intestinalen Sigmabiopsien durchgeführt werden, ist von vornherein durch das Verfahren der endoskopischen Probengewinnung limitiert. So kann die unterschiedliche Verteilung von Lymphfollikeln und freien mukosalen Lymphozyten zwischen einzelnen Biopsien zu Unterschieden in der Lymphozytenhäufigkeit und -zusammensetzung führen (Anton et al., 2001). Da die RNA-Extraktion eine Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Biopsien ausschließt, ist mit dem Vorkommen von Epithelzellen und anderen nicht-mononukleären Zellen in veränderlichen Anteilen auszugehen. Diese beiden Faktoren treffen allerdings für Patienten und Kontrollpersonen gleichermaßen zu. Die höhere Variabilität der Zytokinexpression bei HIV-infizierten Patienten ist daher vermutlich darauf zurückzuführen, dass leichte entzündliche Veränderungen der Mukosa bei der HIV-Infektion in verschiedenen Darmarealen nicht homogen verteilt sind.

Diese lokale Variabilität könnte auch die fehlende Korrelation zwischen mukosaler Zytokin-mRNA-Expression und mukosaler CD4⁺T-Zellzahl, Viruslast oder Krankheitsstadium erklären. Unabhängig davon ist zu berücksichtigen, dass CD4⁺T-Zellzahl und Viruslast in der Mukosa bei der HIV-Infektion und bei Einleitung einer HAART einen nahezu diskontinuierlichen Verlauf mit sehr schnell abfallenden bzw. ansteigenden Werten zeigen (Anton et al., 2003; Kotler et al., 1998; Schmidt et al., 2001; Talal et al., 2001).

Trotz der massiven Veränderung der zellulären Zusammensetzung mukosaler Immunzellen unter HAART fanden wir erstaunlicherweise keine signifikanten Veränderungen der Zytokinexpression. Dies deutet darauf hin, dass CD4⁺- und CD8⁺T-Zellen der Mukosa gleichermaßen zur Zytokinexpression beitragen und der Effekt der einwandernden CD4⁺T-Zellen durch die Abnahme der CD8⁺T-Zellen ausgeglichen wird. Daneben könnte auch der kürzlich beschriebene Abfall regulatorischer T-Zellen im lymphatischen Gewebe HIV-infizierter Patienten unter HAART (Anderson et. al., 2005) den Wegfall der Stimulation durch HIV durch den Wegfall der regulatorischen Hemmung der Zytokinexpression ausgleichen.

Ob und zu welchem Zeitpunkt sich die beschriebene Immunaktivierung unter effektiver Virussuppression zurückbildet, ist derzeit unklar. Es ist allerdings beispielsweise auch bei der durch Gluten verursachten mukosalen Entzündung bei Patienten mit einheimischer Sprue bekannt, dass die Elimination des Antigens durch glutenfreie Diät zwar zu einer schnellen klinischen Besserung führt, die entzündlichen Schleimhautveränderungen jedoch noch nach Monaten nachweisbar sind. Zur Klärung dieser Frage sind Untersuchungen HIV-infizierter Patienten unter langfristig suppressiver Therapie erforderlich.

Zumindest neun Monate nach effektiver HAART finden sich in der intestinalen Mukosa eine im Vergleich zu Kontrollen sehr hohe Anzahl von CD4⁺T-Zellen und eine hohe Expression inflammatorischer Zytokine, die unter anderem auch die Expression der HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 stimulieren (Patterson et al., 1999). Es liegen damit zahlreiche Zielzellen unter für die HIV-Infektion und -Replikation optimalen Bedingungen vor, die bei Therapieversagen oder Therapiepausen Ausgangspunkt für einen schnellen und ausgeprägten Rebound des HIV sein können.