Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

Einfluß genetischer Variationen im Tumor Nekrose Faktor-alpha Gen auf die Progression der HIV-Infektion und die Entstehung HIV-assoziierter Krankheiten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der
Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von
Antje Schüttlöffel

Berlin 2001

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Köttgen

2. PD Dr. med. L. Roewer

3. PD Dr. med. J. Rockstroh

Datum der Promotion: 08.01.2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung 1

1.1 Infektion mit dem HI-Virus 1

1.2 Immunologische Aspekte 2

1.3 Infektion der Zelle 3

1.4 TNF-α und HIV-Infektion 5

1.5 Genetik des TNF-α 6

1.6 HIV-Enzephalopathie 7

1.7 Wasting Syndrom 8

2 Material 11

2.1 Patienten 11

2.2 Gesunde Kontrollen 12

2.3 Chemikalien 13

2.4 Geräte 14

3 Methoden 15

3.1 DNA-Extraktion 15

3.2 Polymerasekettenreaktion 15

3.3 Primer 16

3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 17
3.4.1 Vorbereitung 17
3.4.2 Gelherstellung 18
3.4.3 Trennung der DNA-Fragmente 18
3.4.4 Silberfärbung 19

3.5 Sequenzierung 19

3.6 SSCP-Analyse 20

3.7 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse 21

3.8 Software 23

3.9 Statistik 23

4 Ergebnisse 24

4.1 SSCP 24
4.1.1 Screening nach Polymorphismen im TNF-α-Gen mittels SSCP 24
4.1.2 Vergleich der SSCP Produkte 24

4.2 RFLP 25

4.3 Sequenzierung 27
4.3.1 Darstellung des AP3-Allels (-238) 27

5 Statistische Auswertung 28

5.1 Allelfrequenzen 28

5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht 30
5.2.1 Kontrollkollektiv 30
5.2.2 HIV-Kollektiv 31

5.3 Geschlechtsverteilung 32
5.3.1 Kontrollkollektiv 32
5.3.2 HIV-Kollektiv 33

5.4 Infektionsweg 34

5.5 Analyse der Determinaten des klinischen Verlaufs 35
5.5.1 CD4-positive T-Lymphozyten 35
5.5.2 Zeitliche Progression der HIV-Krankheit 37
5.5.3 Wasting Syndrom und HIV-Enzephalopathie 38

6 Diskussion 40

6.1 Allelfrequenzen 41

6.2 Zeitliche Progression der Krankheit 42

6.3 CD4-Zellen 43

6.4 Wasting Syndrom 45

6.5 HIV-Enzephalopathie 46

6.6 Methodische Aspekte 48

Ausblick 50

Zusammenfassung 51

Anhang: CDC-Klassifikation 52

Literaturverzeichnis 54

Danksagung 66

Lebenslauf 67

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: SSCP-Darstellung der Promotorabschitte des TNF-α 24
Abb.2: SSCP-Darstellung der Exonabschitte des TNF-α 24
Abb.3: SSCP-Darstellung des Promotorabschnitts 2 25
Abb.4: RFLP-Darstellung des AP2-Allels 26
Abb.5: RFLP-Darstellung des AP3-Allels 26
Abb.6: RFLP-Darstellung des AP4-Allels 26
Abb.7: Sequenzierung des AP3-Allels, Wildtyp 27
Abb.8: Sequenzierung des AP3-Allels, Wildtyp 27
Abb.9: Sequenzierung: AP3-Allel, heterozygot 27
Abb.10: Sequenzierung: AP3-Allel, heterozygot 27

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs 12
Tab.2: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die SSCP-Analyse 16
Tab.3: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die RFLP-Analyse 16
Tab.4: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die SSCP-Analyse 17
Tab.5: Rezeptur für SSCP- und RFLP-Gele 18
Tab.6: Nukleotidsequenz des TNF2-Allels an Position -308 22
Tab.7: Fragmentlängen des AP2-Allels nach Verdau mit Sau96 I 22
Tab.8: Nukleotidsequenz des TNF3-Allels an Position -238 22
Tab.9: Fragmentlängen des AP3-Allels nach Verdau mit Ava II 22
Tab.10: Nukleotidsequenz des TNF4-Allels an Position -244 23
Tab.11: Fragmentlängen des AP4-Allels nach Verdau mit Dde I 23
Tab.12: Übersicht über die Kollektive und die Verteilung der Allele 28
Tab.13: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: Kontrollkollektiv 30
Tab.14: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: HIV-Kollektiv 31
Tab.15: Geschlechterverteilung im Kontrollkollektiv 32
Tab.16: Geschlechterverteilung im HIV-Kollektiv 33
Tab.17: Infektionsmodus 34
Tab.18: Infektionsmodus 35
Tab.19: CD4-Zellverlauf 36
Tab.20: CD4-Zellverlauf 37
Tab.21: Zeitraum von ARC bis AIDS 37
Tab.22: Wasting Syndrom 38
Tab.23: HIV-Enzephalopathie 39
Tab.24: Die CDC-Klassifikation 52
Tab.25: Klinische Kategorien der CDC-Klassifikation 53

Abkürzungen

A	Adenosin
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARC	AIDS Related Complex
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
Bis	Bis-Acrylamid
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CDC	Centers for Disease Control
DB	Proteolyse Puffer
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Histokompatibilitätsantigen
Iκ-B	Inhibitor des NF-κB
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
l	Liter
LTNP	Long-Term Non-Progressor (langzeitüberlebender Patient)
m	milli = 10^{-3}
µ	mikro = 10^{-6}
M	Mol pro Liter

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Mittelwert
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF-κB	Nuklearer Faktor-κB
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
p.a.	per annum
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RP	rapid progressors (schnelle Progressoren)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SSCP	single-strand conformation polymorphism (Einzelstrangkonformations-Variantenanalyse)
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units (Enzymeinheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Infektion mit dem HI-Virus

Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) weist eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität des Krankheitsverlaufes auf. Dies gilt auch für Patienten, die von dem gleichen Überträger infiziert wurden *(Liu et al. 1997)*. Es gibt demnach neben den Virulenzfaktoren des Erregers auch genetische Determinanten des Wirtes, die einen Einfluß auf die Progression und die Ausprägung der Krankheit haben *(Fouchier et al. 1996)*. Die Infektion immunkompetenter Zellen mit HIV führt zu deren progredientem Verlust. Die daraus resultierende Abwehrschwäche disponiert zu opportunistischen Infektionen und Tumore, die letztendlich zum Tode führen. In den meisten Fällen wird HIV sexuell übertragen *(Roper et al. 1993)*. Weitere Transmissionswege sind verseuchtes Drogenbesteck, die Transfusion kontaminierter Blutprodukte und die perinatale Infektion des Neugeborenen.

Die initiale HIV-Krankheit zeigt bei fast allen Patienten grippeähnliche Symptome. Die CD4-positiven T-Lymphozyten (CD4-Zellen) sind zum Zeitpunkt der Serokonversion, spätestens jedoch drei Monate nach der Infektion, bereits auf ein Drittel des Ausgangswertes (800 - 1200 Zellen/µl) abgefallen *(Kaufmann et al. 1999)*. Im anschließenden Lymphadenopathiestadium bleiben die immunologischen Parameter stabil. Die Progredienz der Krankheit zum AIDS Related Complex (ARC) ist durch das Absinken der CD4-Zellen unter 400/µl und gelegentlich auftretende opportunistische Infektionen gekennzeichnet. Es vergehen ca. 10 Jahre, bis nach der Infektion die Symptome des AIDS auftreten. Die irreversible zelluläre Immunschwäche manifestiert den Übergang ins AIDS Stadium. Unterschreiten die CD4-Zellen den Wert von 200/µl, ist mit dem Auftreten schwerer opportunistischer Infektionen und maligner Tumore zu rechnen *(Ciaffoni et al. 1992)*. In der Spätphase kommen bei manchen Patienten weitere Symptome hinzu, wie eine starke Gewichtsabnahme (Wasting Syndrom) oder die Entwicklung einer Demenz (HIV-Enzephalopathie).

Das nur 100 nm messende Virus aus der Gruppe der Lentiviren enthält in seinem ikosaedrischen Inneren RNA-haltige Genomstrukturen, die für verschiedene Proteine kodieren. Diese sind für die Infektiosität, die Inkorporierung und die Replikation des

Virus von Bedeutung. Die äußere Hülle besteht aus einer Doppellipidmembran sowie den Glykoproteinen gp120 und gp41. Das gp120 interagiert mit dem CD4-Rezeptor der Zielzelle *(Lasky et al. 1987)*. Das transmembranäre gp41 vermittelt die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran und damit die virale Initiierung. Im Inneren ist das konische Nukleokapsid lokalisiert, das zwei identische virale RNA-Genome enthält. In seiner Funktionalität entspricht das virale Genom dem einer mRNA. Erst nach Umschreiben der RNA in DNA durch die reverse Transkriptase kann die virale Erbinformation mit Hilfe der Ligase in die DNA des Wirts integriert werden, womit die Voraussetzung für die Replikation und damit das Weiterleben des Virus gegeben sind.

1.2 Immunologische Aspekte

Als Eintrittspforten für das HI-Virus dienen meist mikrotraumatische Defekte der Schleimhaut. Untersuchungen an Affen lassen darauf schließen, daß die dendritischen Zellen als erste infiziert werden *(Spira et al. 1996)*. Diese zur Antigenpräsentation befähigten Zellen disseminieren nach der Infektion ins regionale Lymphgewebe. Die CD4-positiven T-Lymphozyten des Parakortex des lymphatischen Gewebes können im inaktivierten Zustand zwar mit dem Virus infiziert werden, die Replikation bleibt allerdings im Stadium der Translation der RNA in DNA stehen. Die Präsentation viraler Strukturen durch MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche der dendritischen Zellen führt zur spezifischen Aktivierung der CD4-Zellen (MHC Klasse II) sowie der CD8-Zellen (MHC Klasse I). Erst die zelluläre Aktivierung ermöglicht eine vollständige Virusreplikation.

Durch die ausgeprägte Virusvermehrung kommt es initial zur Ausbildung einer erregerspezifischen Immunantwort. Humorale Mechanismen der Viruseliminierung tragen durch Antigen-Antikörper-Komplexe zur Inaktivierung bei, indem die gebundenen Immunkomplexe in den Netzwerken der follikulär-dendritischen Zellen abgelagert werden. Im weiteren erfolgt eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und Interleukin 6 (IL-6). Zu den zellulären Mechanismen zählen in erster Linie die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten. Ihre Aufgabe besteht in der Erkennung und Beseitigung virusinfizierter Zellen *(Pantaleo und Fauci 1995)*.

Die Nachbarschaft zwischen antigenpräsentierenden Zellen, CD4-Zellen und infektiösen Virionen begünstigen ebenso wie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (TNF-α und IL-6) die Virusreplikation im lymphatischen Gewebe. Die Viruskonzentration im lymphatischen Gewebe ist um ein Vielfaches höher als in den CD4-Zellen des peripheren Blutes. Gleiches gilt für die Rate der Virusreplikation, die im Lymphgewebe gegenüber den peripheren Lymphozyten um das 10- bis 100fache erhöht ist *(Pantaleo et al. 1993)*. Ein weiteres Virusreservoir stellt das zentrale Nervensystem dar *(Edinger et al. 1999)*. Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium der HIV-Infektion kommt es während opportunistischer Infektionen zum Anstieg der Plasmavirämie, als deren Ursache die gesteigerte Replikationsrate des Virus in Makrophagen angesehen wird *(Orenstein et al. 1997)*.

1.3 Infektion der Zelle

Bereits 1984 konnte der CD4-Rezeptor als primärer Ligand des HI-Virus identifiziert werden *(Klatzmann et al. 1984)*. Transfektionsexperimente an Mauszellen zeigten jedoch bald, daß die ausschließliche Expression des humanen CD4 auf der Zelloberfläche für einen erfolgreichen Viruseintritt nicht ausreichend ist *(Maddon et al. 1986)*. Aus diesem Grund wurde die Existenz eines Korezeptors oder mehrerer Korezeptoren postuliert.

Feng et al. isolierten 1996 CXCR4 (Fusin) als den gesuchten Korezeptor. Im gleichen Jahr konnte durch fünf unabhängige Arbeitsgruppen die Existenz eines weiteren Korezeptors (CCR5) nachgewiesen werden *(Alkhatib et al. 1996, Choe et al. 1996, Deng et al. 1996, Doranz et al. 1996, Dragic et al. 1996)*.

CXCR4 und CCR5 gehören zu einer Gruppe heptahelikaler Rezeptoren, welche Chemokinsignale transduzieren. Chemokine sind proinflammatorische Zytokine, die in der Lage sind, Leukozyten durch Chemotaxis zu aktivieren. Die Infektion der CD8-Zellen mit HIV führt zur Synthese der Chemokine und somit zur Aktivierung der immunologischen Antwort *(Cocchi et al. 1995)*.

Die Bindung des viralen gp120 an den CD4-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Virusproteins, welches das Andocken der V3-Schleife des gp120 an den entsprechenden Chemokinrezeptor ermöglicht. Erst danach ist die gp41 vermittelte Fusion beider Membranen und die Initiierung des Virus möglich.

Experimente an infizierten Zellinien zeigten, daß in der frühen Phase der Infektion primär Monozyten/Makrophagen infiziert werden (sog. M-Tropismus), während im weiteren Verlauf HI-Viren selektiert werden, die vornehmlich T-Zellen befallen (T-Tropismus). Die Identifizierung der Chemokinrezeptoren als HIV-Korezeptoren erklärt diese Phänomene: In der frühen Infektionsphase fungiert CCR5 als Korezeptor, was zu einer Selektion zugunsten M-troper Virusisolate führt. Die Nutzung des CXCR4 als Korezeptor wird infolge kompetitiver Hemmung durch den CXCR4-Liganden SDF1 (stromal cell-derived factor 1) erschwert, da dieser an CXCR4 bindet und den Rezeptor für weitere Interaktionen blockiert *(Oberlin et al. 1996, Bleul et al. 1997)*. Somit wird die Infektion der CXCR4-exprimierenden T-Zellen unterbunden. SDF1 entstammt Zellen des lymphatischen Gewebes. Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch den progredienten Untergang dieses Gewebes zum Ausfall des CXCR4-Liganden. Die zunehmende Infektion von Zellen der T-Zellinie ist Ausdruck dieser Veränderungen.

Weitere Korezeptoren (CCR3, CCR2B, STRL33, GPR15 und GPR1) konnten inzwischen identifiziert werden, deren genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist *(Deng et al. 1997, Farzan et al. 1997, Liao et al. 1997)*.
CCR5 besteht aus 352 Aminosäuren und fungiert als Rezeptor für die Chemokine RANTES, MIP-1α und MIP-1β. Vor kurzem konnte eine Deletion von 32 Basenpaaren im CCR5-Gen identifiziert werden, die in hoher Frequenz bei Kaukasiern, nicht aber bei Afrikanern oder Asiaten zu finden ist *(Samson et al. 1996, Zimmermann et al. 1997)*. Durch die Deletion (Δ32-CCR5) kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens mit konsekutiv vorzeitigem Kettenabbruch bei der Proteinsynthese. Es resultiert ein nicht funktioneller Korezeptor, der die Membranfusion oder die Infektion von M-tropen HIV-1 Isolaten nicht mehr unterstützt *(Samson et al. 1996)*. Nach bisherigen Untersuchungen ist davon auszugehen, daß homozygote Träger der 32bp-Deletion weitgehend resistent gegenüber einer HIV-Infektion sind, während bei heterozygoten Merkmalsträgern lediglich eine verminderte Krankheitsprogression anzunehmen ist *(Paxton et al. 1996, Liu R. et al. 1996, Samson et al. 1996)*.

CCR2 ist ein weiterer Chemokinrezeptor, bei dem ein Polymorphismus mit einem protrahierten Verlauf der Krankheit assoziiert ist: Ein heterozygoter

Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin im Kodon 64 (V64I), welcher in der ersten transmembranären Domäne lokalisiert ist, korreliert mit einem um zwei bis vier Jahre verzögerten Krankheitsbeginn *(Smith et al. 1997)*. Im weiteren sind Assoziationen mit bestimmten MHC-Genen wie dem Haplotyp A1-B8-DR3 oder den B*35- und Cw*04-Allelen und einer beschleunigten Krankheitsprogression bei HIV-Infektion beschrieben worden *(Steel et al. 1988, Carrington et al. 1999)*.

1.4 TNF-α und HIV-Infektion

Die HIV-Infektion stellt einen Zustand permanenter immunologischer Aktivierung dar. Der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-α) nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein *(Haynes et al. 1996)*. TNF-α ist ein Zytokin mit potenter immunmodulatorischer Wirkung und bedeutendem Einfluß auf die Zytokinfreisetzung und die Zellaktivierung. TNF-α wird in aktivierten Zellen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten) synthetisiert. Über zwei transmembranäre Rezeptoren (TNFRSF1A und TNFRSF1B) wird die intrazelluläre Signaltransduktion des TNF-α vermittelt *(Stauber et al. 1988, Brockhaus et al. 1990)*. Aktivierte Immunzellen werden zur Phagozytose und durch autokrine Stimulation zur weiteren Synthese des Mediators angeregt. Daneben beeinflußt TNF-α die Granulombildung *(Kindler et al. 1989)*, die Wundheilung *(Sugarman et al. 1985)* sowie die Gefäßpermeabilität *(Royall et al. 1989).*

TNF-α wird durch mehrere Mechanismen reguliert: Die Limitierung der biologischen Aktivität wird in erster Linie durch IL-10 *(De Waal et al. 1991)*, TGF-β *(Platzer et al. 1995, Randow et al. 1995)*, aber auch durch Kortisol *(Zabel et al. 1989)* und die löslichen Rezeptoren sTNFRSF1A und sTNFRSF1B gesteuert. Stimulierend wirken IL-1, IL-6 und IL-8 sowie IFN-γ *(Philip et al. 1986, Szeffler et al. 1989)*.

Die transkriptionelle Regulation des TNF-α erfolgt durch den nuklearen Transkriptionsfaktor NF-κB. Die Stimulation der TNF-α-Rezeptoren bewirkt die Ablösung des inhibierenden Iκ-B vom Transkriptionsfaktor NF-κB *(Tartaglia et al. 1993)*. NF-κB kann nun in den Zellkern eintreten und an seine Bindungsstelle (κ3) im TNF-α-Promotor binden *(Papavassiliou et al. 1995)*. Folge ist eine gesteigerte Transskriptionsrate *(Osborne et al. 1989)*, die zu einer Erhöhung der TNF-α-

Konzentration im peripheren Blut führt.
Die verstärkte TNF-α-Synthese bei HIV-Infektion ist Folge einer erhöhten NF-κB-Aktivität: Das virale tat-Protein vermag NF-κB zu aktivieren, welcher über die Bindung an die LTR-Regionen (long terminal repeats) des HI-Virus seinerseits die HIV-Replikation induziert *(Chen et al. 1997, Nath et al. 1999)*. Die virale Replikation ist gekoppelt an die zelluläre Aktivierung. Im inaktiven Zustand der infizierten Zelle weisen die Promotoren in den HIV-LTR nur eine niedrige basale Aktivität auf. Für die NF-κB vermittelte Erhöhung der viralen Transkriptionsrate ist neben der Aktivierung des Viruspromotors auch die Bindung des tat-Gens an NF-κB notwendig, da diese Verbindung einen ausgeprägten Einfluß auf die Expression des HIV-Promotors hat *(Alcami et al. 1995)*.

1.5 Genetik des TNF-α

Die für TNF-α und TNF-β kodierenden Gene befinden sich auf Chromosom 6 zwischen den MHC Klasse I und II Loci. Das humane TNF-α-Gen ist ca. 3 kb lang und besitzt vier Exons *(Nedwin et al. 1985)*. Das Gen kodiert für ein Protein mit 230 Aminosäuren, aus dem durch limitierte Proteolyse das reife, 157 Aminosäuren lange Protein entsteht *(Pennica et al. 1984)* (Gen Bank accession number U42625).

Nedwin et al. entdeckten den ersten biallelen Polymorphismus im TNF-α-Gen, der sich an Position -244 (AP4) relativ vom Transkriptionsstart befindet *(Nedwin et al. 1985)*. Weitere Dimorphismen wurden an Position -308 (AP2) *(Wilson et al. 1992)* und an Position -238 (AP3) *(D'Alfonso et al. 1994)* beschrieben. Bei den genannten Nukleotidvariationen liegt jeweils eine Transition von Guanin (G) zu Adenin (A) vor. Andere Polymorphismen wurden an Position -857, -851, -376, -163 sowie bei +691 identifiziert *(Hamann et al. 1995, Herrmann et al. 1998).*

Die Berichte über hohe TNF-α-Serumkonzentrationen bei Patienten mit zerebraler Malaria *(Kwiatkowski et al. 1990)* veranlassten McGuire und Mitarbeiter zu einer großen Fallkontrollstudie bei Kindern aus Gambia *(McGuire et al. 1994)*. Diese zeigte, daß Patienten mit dem homozygoten TNF2-Allel ein relatives Risiko von sieben hatten, an einer zerebralen Malaria zu versterben. Die Assoziation war unabhängig von den MHC-Klasse I oder II Genotypen.

Transfektionsexperimente konnten zeigen, daß das TNF2-Allel zu einer sechs- bis siebenfachen Erhöhung der Tranksskriptionsrate im Vergleich zum Wildtyp (TNF1) führt *(Wilson et al. 1997, Kroeger et al. 1997).* Diese Steigerung der Transkriptionsrate wird als ursächlich für die Assoziation des TNF2-Allels mit der Disposition zu schweren Verläufen bestimmter Infektionskrankheiten betrachtet.
Für andere Erkrankungen fanden sich ebenfalls Zusammenhänge: Die Anfälligkeit für mukokutane Leishmaniasis *(Cabrera et al. 1995)*, für lepromatöse Lepra *(Roy et al. 1997)*, für das vernarbende Trachom *(Conway et al. 1997)*, für Asthma bronchiale *(Moffatt et al. 1997)* sowie den tödlichen Verlauf bei Meningokokkeninfektion *(Nadel et al. 1996)* war bei vorhandenem TNF2-Allel signifikant erhöht.

1.6 HIV-Enzephalopathie

Die HIV-Enzephalopathie ist charakterisiert durch kognitive und motorische Dysfunktion sowie Verhaltensauffälligkeiten und entwickelt sich typischerweise erst im Spätstadium der HIV-Infektion mit einer Prävalenz von ca. 8% *(Martinez et al. 1995)*. Sie ist eine der häufigsten ZNS-Komplikationen der späten HIV-Erkrankung. Charakteristischerweise manifestiert sich die HIV-Enzephalopathie erst, wenn bereits schwere opportunistische Infektionen oder Tumore aufgetreten sind, die den Übergang ins AIDS-Stadium anzeigen *(Price et al. 1995)*. Klinische Zeichen sind Ataxie, Spastik, Paraplegie und Hyperreflexie tiefer Sehnenreflexe. Prädilektionsorte der Läsionen sind subkortikale Strukturen des ZNS (Marklager, Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark). Histomorphologisch ist die HIV-Enzephalopathie gekennzeichnet durch Gliosen, multinukleäre Enzephalitiden und fokale Nekrosen.

Klinische Beobachtungen sowie Tiermodelle legen nahe, daß die HIV-Enzephalopathie durch das HIV selbst hervorgerufen wird und nicht durch einen anderen (opportunistischen) Erreger. Der exakte pathophysiologische Mechanismus ist bis jetzt nicht vollständig verstanden. Neuere Daten weisen darauf hin, daß eine zerebrale Zytokinerhöhung eine Schlüsselrolle in diesem Prozeß einnimmt. Die erhöhte Zytokintranskription nichtinfizierter Nachbarzellen hält die aktivierte HIV-Infektion von Mikroglia, Neuronen und Astrozyten aufrecht *(Sippy et al. 1995)*. Die

Konzentration der HIV-DNA korreliert dabei mit der klinischen Ausprägung der HIV-Enzephalopathie *(Nuovo et al. 1996)*.

Die bei AIDS auftretenden demenzartigen Symptome sind demnach zum einen Folge der Infektion neuronaler Makrophagen und Gliazellen, zum anderen Folge der durch virale Proteine bedingten Zytokindysregulation. In das ZNS eingewanderte Makrophagen und neuronale Glia werden durch virale tat-Proteine zur Synthese von TNF-α angeregt, wodurch die Kaskade der aktivierten Entzündung des ZNS in Gang gesetzt und gehalten wird *(Chen et al. 1997)*. Der Schweregrad der neurologischen Beteiligung korreliert mit der mRNA-Konzentration des TNF-α im Liquor cerebrospinalis *(Mayne et al. 1998)*. Wie eine weitere Studie belegt, ist die TNF-α-Konzentration im Liquor ein guter Parameter für das Ausmaß der ZNS-Beteiligung bei HIV-Patienten *(Mastroianni et al. 1992)*.

1.7 Wasting Syndrom

Der unbeabsichtigte Gewichtsverlust im Rahmen der späten HIV-Erkrankung (Wasting Syndrom) ist eine häufige Komplikation, unter der ca. 20% der AIDS-Patienten leiden *(Hoover et al. 1993, Hellerstein et al. 1996)*. Untersuchungen zur Zusammensetzung des Körpers haben gezeigt, daß beim Wasting Syndrom Körperfett und funktionelle Körpermasse gleichermaßen reduziert sind *(Kotler et al. 1985)*.

Pathophysiologisch liegt dem Wasting eine metabolische Dysregulation und nicht eine reduzierte Kalorienzufuhr bzw. eine durch Darminfektionen bedingte Malabsorption zugrunde *(Hellerstein et al. 1990, Strawford et al. 1998)*. Im Gegensatz zu Hungerzuständen sind beim Wasting Syndrom die Konzentrationen der Serumtriglyzeride erhöht (*Hellerstein et al. 1993, Strawford et al. 1998)*. Es wird vermutet, daß diese paradoxe Hypertriglyzeridämie durch Zytokine wie TNF-α, Interleukine und Interferone verursacht wird *(Feingold et al. 1989, Blackham et al. 1992).* Die Konzentration an TNF-α und dessen löslichen Rezeptoren sind beim Wasting Syndrom im Blut signifikant erhöht *(Suttmann et al. 1994)*. Aus diesen Beobachtungen sind Therapieansätze mit Antizytokinen wie Pentoxifyllin oder Thalidomid entwickelt worden.

Der Wirkstoff Pentoxifyllin ist für den Einsatz bei Claudicatio intermittens zugelassen.

Die Verwendung bei Karzinompatienten mit Kachexie hatte eine deutliche Verbesserung des Allgemeinzustandes zur Folge. Dies führte zu Versuchen an HIV-Patienten, die unter dem Wasting Syndrom litten. Die unter Studienbedingungen verabreichten hohen Dosen an Pentoxifyllin führten durch die Hemmung von NF-κB *(Dezube et al. 1995, Fazely et al. 1991)* und cAMP *(Endress et al. 1991)* zur Reduktion der TNF-α Konzentration im Blut. Allerdings kam es nicht zum gewünschten Anstieg des Körpergewichts, obwohl sich das Wohlbefinden der Patienten subjektiv besserte.

Thalidomid ist ein potentes Antizytokin, das durch Degradation der TNF-α-mRNA in Monozyten die TNF-α-Sekretion vermindert. Die Thalidomidgabe ist indiziert bei Entzündungen, die mit TNF-α induzierter Toxizität einhergehen, wenn gleichzeitig auf die Erhaltung der Immunität geachtet werden muß *(Moreira et al. 1993)*. Bei HIV-Patienten bewirkt es eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes und eine Besserung des subjektiven Befindens *(Reyes-Teran et al. 1996)*.

1.8 Fragestellung

Die Infektion mit HIV und die Progression der Erkrankung wird durch Virulenzfaktoren des Erregers als auch durch genetische Determinanten des Wirtes beeinflußt.

Genetische Alterationen im humanen CCR5 und CCR2 sind durch ein modifiziertes virales Bindungsverhalten an der Zelle mit einer Resistenz oder einem protrahierten Krankheitsverlauf assoziiert. Im weiteren korrelieren bestimmte MHC-Allele mit einer beschleunigten Progredienz der Erkrankung.

TNF-α wird bei der HIV-Infektion eine bedeutende pathophysiologische Rolle zugeschrieben: Das tat-Protein des HI-Virus induziert über die Aktivierung des humanen Transkriptionsfaktors NF-κB und Bindung desselben an die LTR-Region des Virus nicht nur seine eigene Replikation, sondern auch über den gleichen Mechanismus die Transkription von TNF-α. TNF-α wiederum potenziert die HIV-Replikation durch Induktion von NF-κB.

Genetische Alterationen im TNF-α-Promotor sind bei Malaria mit einem erhöhten Risiko für zerebrale Komplikationen assoziiert. Auch für andere Infektionskrankheiten konnten signifikante Assoziationen mit TNF-α-Polymorphismen gefunden werden.

In der vorliegenden Studie sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit Polymorphismen im TNF-α-Gen einen modulierenden Einfluß auf die Krankheitsprogression oder die Entstehung bzw. Ausprägung der HIV-assoziierten Enzephalopathie oder des Wasting Syndromes haben.

Hierfür wurden die Promotorregion und die kodierenden Sequenzen einschließlich der Exon-Intron-Übergänge des TNF-α-Gens bei 92 gesunden Kontrollen mittels SSCP-Analyse (single-strand conformation polymorphism) auf unbekannte genetische Variationen untersucht. Zusätzlich erfolgte bei 251 HIV-Patienten eine Charakterisierung der häufigsten Promotorpolymorphismen (-238A, -244A und -308A) mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP). Die erhobenen Genotypen wurden mit den klinischen Daten der untersuchten Patienten korreliert.

2 Material

2.1 Patienten

Alle Patienten wurden in der Tagesklinik für Innere Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum medizinisch betreut.

Die Studiengruppe umfaßte 251 HIV infizierte Patienten. 188 (74,9%) Patienten waren Männer und 56 (22,3%) Frauen. Bei 7 (2,8%) blieb das Geschlecht auf Grund der anonymen Datenerhebung ungeklärt.

Das mittlere Alter der gesamten Gruppe betrug zum Zeitpunkt der Datenerhebung (01.03.1998) 39±9 Jahre (MW±SD), wobei die Frauen jünger waren (34±7 Jahre) als die männlichen Studienteilnehmer (41,6±8,9 Jahre) (MW±SD).

Das häufigste Infektionsrisiko bei Männern waren homosexuelle Kontakte (39%), gefolgt von intravenösem Drogenkonsum (20%) und bisexuellen Kontakten (6%). Heterosexuelle Kontakte (2%), Patienten aus Endemiegebieten und die Infektion über infizierte Blutprodukte (jeweils 1%) stellten seltene Infektionswege bei den männlichen Studienteilnehmern dar. Bei 30% der Männer blieb der Infektionsmodus unklar. Bei den Frauen war der i.v. Drogenabusus (34%) am häufigsten. Danach folgte die Infektion durch heterosexuelle Exposition (29%). Einen unklaren Infektionsweg wiesen 29% der untersuchten Frauen auf. Rund 9% der Patientinnen stammten aus Endemiegebieten.

Die Einteilung der HIV-Patienten erfolgte anhand der CDC-Klassifikation von 1993 (siehe Anhang). Die CD4-Zellzahlen lagen im Gesamtkollektiv bei 272±234 (MW± SD).

	gesamt		Männer		Frauen		k. A.
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n (%)
Anzahl	251		188	(74,9)	56	(22,3)	7 (2,8)
Alter (MW±SD)	39,9	(9)	41,6	(8,9)	34,4	(6,9)	
CDC-Stadien	(n=244)						
CDC-A	95	(38,9)	70	(28,7)	25	(10,3)	
CDC-B	71	(29,1)	55	(22,5)	16	(6,6)	
CDC-C	78	(32,0)	63	(25,8)	15	(6,2)	
CD4-Zellen/µl *	(n=222)						
	272	(234)	261	(234)	307	(234)	

Tab.1: Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs
* MW±SD, CDC = Centers for Disease Control, CDC-A beschreibt asymptomatische HIV-Patienten, CDC-B beinhaltet symptomatische Patienten, jedoch ohne AIDS definierende Erkrankungen, CDC-C umfaßt Patienten mit AIDS definierenden Erkrankungen. k.A.: keine Angabe

Eine mündliche Aufklärung über die Ziele, die wissenschaftliche Bedeutung und den Ablauf der Studie sowie über die Durchführung molekulargenetischer Analysen erfolgte bei sämtlichen Teilnehmern. Die Untersuchungen der Patienten und die Blutentnahmen erfolgten durch die Ärzte der Tagesklinik.

Die serologische Analyse auf HIV-Antikörper erfolgte in der Charité durch den Antikörpertest der Firma Abbott (Illinois, USA). Durch Western-Blot (Pasteur Diagnostics, Marnes de Coquette, Frankreich) wurde der positive ELISA-Test bestätigt.

Für die Extraktion der DNA wurden die durch die Tagesklinik anonymisierten HIV-positiven EDTA-Blutproben aufgearbeitet.

2.2 Gesunde Kontrollen

Die zur Kontrolle eingesetzten DNA-Proben entstammten dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité. Als Spender dienten 211

gesunde Studierende (77 männliche, 96 weibliche und 38 ohne Angabe) der Humboldt-Universität im mittleren Alter von 25±4,9 Jahren (MW±SD). Allen Teilnehmern der Kontrollgruppe wurde nach ausführlicher Aufklärung über die weitere Diagnostik und nach schriftlicher Zustimmung venöses Blut zur Analyse entnommen.

2.3 Chemikalien

- Thermus aquaticus Polymerase (Taq Polymerase), PCR-Puffer und sämtliche Desoxynukleosidtriphosphate wurden von der Firma Perkin Elmer (Überlingen, Deutschland) bezogen.
- Die Primersynthese erfolgte bei TIB Molbiol (Berlin, Deutschland).
- Bayol F wurde von Serva (Heidelberg, Deutschland) erworben.
- PCR Reaktionsgefäße mit zugehörigen Deckeln sowie die PAG Folie wurden bei der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) erworben.
- Proteinase K stammte von Boehringer Mannheim (Mannheim).
- Pharmacia (Freiburg, Deutschland) lieferte Repel-Silan zur Präparation der Glasplatten.
- Von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) stammten Harnstoff, Tween 20 und Polyethylenglykol.
- Acrylamid, N,N‘-Methylenbisacrylamid (Bis), N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin und Ammoniumpersulfat wurden bei Biorad Laboratories (Richmond, Ca., USA) erworben.
- Von New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen wir die Restriktionsenzyme Ava II, Dde I und Sau96 I sowie die zugehörigen Puffer.
- QIAquick PCR Purification Kit und QIAquick Nucleotid Removal Kit stammten von Qiagen (Hilden, Deutschland).
- DyeTerminatoren erwarben wir bei der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).
- TBE Puffer für die Sequenzierung und 100 bp DNA-Leiter wurden von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

- Alle übrigen Substanzen, soweit nicht anders erwähnt, waren mit Reinheitsgrad p.A. von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

2.4 Geräte

- Glasplatten für die Polyacrylamidgele sowie die Elektrophoresekammern (Multiphor II) stammten von der Firma Pharmacia (Stockholm, Schweden).
- Für die pH-Metrie wurde das pH-Meter PHM 62 der Firma Radiometer Kopenhagen (Kopenhagen, Dänemark) verwendet.
- Von der Firma Biorad Laboratories (Richmond, Ca., USA) stammte das Netzteil für die Horizontalelektrophorese (Powerpac 3000).
- Die Thermocycler (UNO und TRIO) waren von der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland).
- Die Firma Stratagene (Heidelberg, Deutschland) stellte den Gradiententhermocycler (Robocycler) her.
- Die Thermostaten (DC3-K20) für die Elektrophorese wurden von der Firma Haakle (Karlsruhe, Deutschland) produziert.
- Zentrifugationsarbeiten wurden mit der Zentrifuge 5417R der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt.
- An Zentrifugen der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland) erfolgten die Arbeiten für die DNA-Extraktion (Labofuge M) und die Sequenzierung (Lyophillisierung an Centrivac-Zentrifuge).
- Für Arbeiten während der DNA-Extraktion und der SSCP wurden die Thermoblöcke Thermostat 3401 der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) eingesetzt.
- Zur Sequenzierung wurde der Sequenzer ABI 373A von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
- Arbeiten an der Analysenwaage fanden an dem Gerät 2006MP der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) statt.

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Prinzip: Die DNA wird aus Leukozyten nach Lyse der kernlosen Erythrozyten und Proteindegradation mittels Proteinase K gewonnen.

Durch Zugabe von 1 ml TE-Puffer (1 M Tris/HCl, pH 8,0; 200 mM EDTA/NaOH, pH 8,0) zu 300 µl EDTA-Blut wurden die Erythrozyten lysiert. Nach sorgfältigem Mischen mittels Vortex erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 min. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 1 ml TE-Puffer resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes erfolgte der Verdau der leukozytären Proteine mit DB-Puffer (1 M KCl; 1 M Tris/HCl pH 8,3; 1 M $MgCl_2$), dem kurz vor Inkubation Proteinase K (1%) zugesetzt wurde, bei 56°C für 60 min. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 25 min bei 95°C hitzedenaturiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C tiefgefroren.

3.2 Polymerasekettenreaktion

Prinzip: Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische Methode der DNA-Vervielfältigung, bei der in mehreren Amplifizierungsrunden Oligonukleotide (Primer) entlang einer Matrizen-DNA (Template) verlängert werden. Dabei wechselt die Temperatur periodisch, so daß die DNA immer wieder denaturiert wird und die Primer nach dem Anlagern (Annealing) verlängert werden (Extension).

Der PCR-Ansatz enthielt 0,5 U Taq-Polymerase, 2,5 µl PCR-Puffer/$MgCl_2$ (0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 0,5 M KCl; 15 mM $MgCl_2$; 0,1% Gelatine), 400 µmol/l Desoxynukleotidtriphosphate (äquimolare Mengen jedes dNTP) und 0,1 µmol/l jedes Primers in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Nach Zugabe von 2,5 µl DNA zum Reaktionsansatz wurde dieser mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet. Die Amplifikation erfolgte in einem automatisierten Thermocycler (Biometra, Göttigen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung für 20 s bei 95°C, Primer-Anlagerung für 20 s (siehe Tabelle 2 - 4 für die primerspezifische Temperatur) und Extension für 15 s bei 72°C sowie eine abschließende Extension bei 72°C für 2 min.

3.3 Primer

Die Oligonukleotidprimer für die PCR des TNF-α-Gens wurden von der Firma TIB-Molbiol auf einem automatischen DNA-Synthesizer entsprechend der in den Tabelle 2 bis 4 angegebenen Nukleotidsequenzen hergestellt. Sie fanden bei der SSCP und beim RFLP Anwendung.

Promotorabschnitt 1				
PF1A	vorwärts	5‘-ACC CCA CCC AgC CTT TCC Tg-3'	60	195
PR1	rückwärts	5'-ACT TCC AgA CAg gAT gCA gg-3'		
Promotorabschnitt 2				
PF2A	vorwärts	5‘-ggA CTC AgC T TT CTg AAg CC-3‘	60	242
PR2	rückwärts	5'-CAT CAA ggA TAC CCC TCA CAC-3'		
Promotorabschnitt 3				
PF3	vorwärts	5‘-AgT CAg Tgg CCC AgA AgA CC-3'	62	301
PR3A	rückwärts	5'-TgC TgT CCT TgC TgA ggg Ag-3'		
Promotorabschnitt 4				
PF4	vorwärts	5'- CAg TTg TTg gCA CAC CCA gC -3'	60	221
PR4	rückwärts	5'-CTC CAC gTC CCg gAT CAT gC-3'		

Tab.2: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die SSCP-Analyse
Von links nach rechts: Name, Richtung, Nukleotidsequenz, Annealing-Temperatur (°C), Fragmentlänge (bp)

TNF2				
PF2A	vorwärts	5‘-ggA CTC AgC TTT CTg AAg CC-3‘	54	281
AP2RM	rückwärts	5'-ggC Cgg ggT TCA gCC TCC AGC gTC CTA CAC TCA AAT CAG TCA-3'		
TNF3 und TNF4				
PMF34	vorwärts	5‘-CAg gCC TCA ggA CTC AAC ACA gC-3‘	62	175
PMRA	rückwärts	5'-gAC CAg ggA ggA Tgg ggA gTg TgA-3'		

Tab.3: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die RFLP-Analyse
Von links nach rechts: Name, Richtung, Nukleotidsequenz, Annealing-Temperatur (°C), Fragmentlänge (bp)

Exon 1				
E1F1	vorwärts	5‘-CTT CAC CCT CTC TCC CCT gg-3‘	60	238
E1R1A	rückwärts	5'-TgA Agg CTg gCC Agg CAC TC -3'		
Exon 2				
E2F1	vorwärts	5‘-CCT TTA Agg gTg ACT CCC TCg-3‘	62	173
E2R1	rückwärts	5'-CCA CTg CTT CCA TAC Cgg TAC -3'		
Exon 3				
E3F1	vorwärts	5‘-ggA AgT TTA Agg gTC TCA gC-3‘	56	119
E3R1	rückwärts	5'-CCA AgA CAC ATC CTC AgA gC-3'		
Exon 4				
E4F1	vorwärts	5‘-ACC gAC ATg gCC ACA CTg AC-3‘	60	373
E4R1	rückwärts	5'-ggT TgA CCT Tgg TCT ggT Agg-3'		
E4F2	vorwärts	5‘-CCA CAC CAT CAg CCg CAT Cg-3‘	66	267
E4R2	rückwärts	5'-ggg AAg gTT ggA TgT TCg TCC-3'		

Tab.4: Primer der kodierenden Regionen des TNF-α-Gens für die SSCP-Analyse
Von links nach rechts: Name, Richtung, Nukleotidsequenz, Annealing-Temperatur (°C), Fragmentlänge (bp)

3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Prinzip: Die Elektrophorese stellt ein biochemisches Trennverfahren dar, mit dem PCR-Amplifikate unterschiedlicher Länge aufgetrennt werden können. Dabei werden die negativen Ladungen der DNA-Phosphatgruppen genutzt, um DNA-Fragmente in einem elektrischen Gleichstromfeld zu trennen. Als Transportmedium dienen Polyacrylamidgele mit Netzstruktur, die in Abhängigkeit der Molekülgröße zu unterschiedlichem Wanderungsverhalten der DNA führen *(Raymond et al. 1959)*.

3.4.1 Vorbereitung

Beide Glasplatten wurden mit Ethanol (70%) gereinigt. Die gummierte Glasplatte wurde mit Repel-Silan präpariert, um nach dem Gießen des Gels dieses leichter von der Glasplatte zu trennen. Klebefolie wurde an vorgesehenen Stellen auf dem gummierten Glas angebracht, so daß im vertikal gegossenen Gel an definierten Stellen Taschen entstanden, die als Auftragungsorte für die PCR-Produkte dienten.

Das Gel wurde aus Gründen der höheren mechanischen Stabilität in der vorbereiteten Glaskassette auf eine Gel-Bond-PAG-Folie gegossen. Die Proben wurden in zwei Reihen à 24 Proben aufgetragen.

3.4.2 Gelherstellung

Polyacrylamid wurde in einen Standzylinder überführt. Gelpuffer, Harnstoff sowie Polyethylenglykol (PEG) (Harnstoff und PEG in Abhängigkeit des Protokolls) wurden zugegeben und mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt (zur Gelzusammensetzung siehe Tab. 5). Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von TEMED (24 µl) und APS (40%, 48 µl) und war nach 60 min beendet.

	Gel 12% $T_{30}C_{0,5}$*	Gel 12% $T_{30}C_2$*	Gel 8% $T_{30}C_2$*	Einheit
Acrylamid	29,85	29,4	29,4	g
Bis-Acrylamid	0,15	0,6	0,6	g
	ad 100 ml H_2O	ad 100 ml H_2O	ad 100 ml H_2O	
Untersuchung	SSCP	SSCP	RFLP	Einheit
Stammlösung *	12	12	8	ml
Harnstoff	-	1,8	1,8	g
5x TBE	6	6	6	ml
PEG (5%)	3	3	-	ml
H_2O	ad 30	ad 30	ad 30	ml
TEMED	24	24	24	µl
APS (40%)	48	48	48	µl

Tab.5: Rezeptur für SSCP- und RFLP-Gele
(* = Stammlösung der Gele)

3.4.3 Trennung der DNA-Fragmente

An den Gelenden wurden puffergetränkte Elektrodenstreifen (5x TBE) angebracht, um eine gleichmäßige Verbindung zwischen Gel und Elektroden sicherzustellen. Nach Auftragen der Proben auf das kathodische Gelende wurde Gleichstrom angelegt. Zur Kontrolle der Elektrophorese und der anschließenden Färbung wurde bei jedem Gel neben der sichtbaren Bromphenolblau-Markierung ein Basenpaar-Marker

aufgetragen. Bei der RFLP-Analyse wurde zusätzlich unverdautes PCR-Produkt desselben Ansatzes aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf Polyacrylamidgelen für 45 min bei 5°C und konstanten 1000 V (RFLP) bzw. für 25 min bei 5°C oder 15°C und konstanten 1200 V (SSCP) in einem Multiphor II-Elektrophoresesystem.

3.4.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Riesner et al. (1989) mit leichten Modifikationen verwendet. Nach Fixierung (10 min in 10% Ethanol und 2% Essigsäure) und einem kurzen Waschvorgang mit Aqua bidest wurden die Gele für 20 min in Silbernitratlösung (Silbernitrat 0,2%) überführt. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Entwicklung im alkalischen Milieu (1,5%, Natriumhydroxid, 0,01% Natriumborhydrid, 0,185% Formaldehyd). Zur Konservierung wurden die PAA-Gele in Plastik eingeschweißt und später dehydriert.

3.5 Sequenzierung

Prinzip. Die PCR-Amplifikate werden mit einem kurzen Oligonukleotid (Primer), dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs sowie einer DNA-Polymerase inkubiert. Nach Anlagerung des Primers an die Matrize erfolgt dessen Verlängerung durch Anbau der entsprechenden dNTPs. Wird statt einem dNTP ein ddNTP eingebaut, kommt es zu einem Syntheseabbruch, da das ddNTP am 3'-C-Atom ein Wasserstoffatom anstatt einer Hydroxygruppe trägt, die für die Addition eines weiteren Nukleotides notwendig wäre *(Sanger et al. 1977)*. Dadurch entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente, deren Größe die Position der jeweiligen Base widerspiegelt. Die enstandenen Fragmente werden in einem Polyacrylamid-Harnstoffgel nach Größe aufgetrennt und fluorchrom nachgewiesen.

Zur Kontrolle, ob die PCR-Produkte für SSCP- und der RFLP-Analyse auch die erwünschten DNA-Bereiche darstellen, wurden die Amplifikate einer Fluoreszenzsequenzierung unterzogen. Es wurden jeweils beide Stränge sequenziert.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des QIAgen PCR Purification Kits nach dem Protokoll der Firma Qiagen.

5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl Vorwärts- oder Rückwärtsprimer und 4 µl Dye-Terminator-Mix (bestehend aus ddNTP, dNTP, Puffer und Taq) versetzt. Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet. Die Bedingungen für die Sequenzierungsreaktion waren: initiale Denaturierung für 2 min bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 15 s, 20 s Primeranlagerung bei 54 - 60°C und 30 s Elongation bei 60°C.

Anschließend wurden die nichtinkorporierten fluoreszenzmarkierten Nukleotide mittels Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers entfernt. Die aufgereinigten Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge für 2 Stunden eingedampft und in 5 µl Formamid/EDTA (EDTA 50 mM) (5:1) aufgenommen. Nach Denaturierung für 2 min bei 95°C wurden die Proben bis zum Auftrag auf Eiswasser gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamid-Harnstoffgel (10 ml Acrylamid:Bis (19:1), 33 g Harnstoff, 14 ml 5x TBE-Puffer, 19 ml Aqua bidest, 175 µl APS (10%) und 28 µl TEMED). Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 bis 2 Stunden. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x TBE.

3.6 SSCP-Analyse

Prinzip: Die SSCP-Analyse (single-strand conformation polymorphism) ist eine Screening-Methode zur Detektion von Unterschieden in der Nukleotidsequenz eines Genabschnittes. Man prüft, ob thermisch denaturierte PCR-Produkte (Einzelstrang-DNA) gleicher Herkunft sich in der Laufgeschwindigkeit in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter verschiedenen Bedingungen, wie Änderung der Temperatur oder der Gelzusammensetzung, unterscheiden. Eine Basensubstitution führt unter Umständen zu einer unterschiedlichen räumlichen Konformation des DNA-Fragmentes durch sequenzabhängige intramolekulare Basenpaarungen und einem dadurch bedingten Mobilitätsunterschied in der Elektrophorese *(Orita et al. 1989)*.

Aliquots von 6 µl PCR-Produkt wurden mit 24 µl Stopplösung (95% Formamid, 10 mM NaOH, 10 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) versetzt. Nach Denaturierung bei 95°C für 2 min erfolgte eine rasche Abkühlung auf Eiswasser, um die Renaturierung der DNA zu Doppelsträngen zu vermindern. 4,5 µl dieses Ansatzes wurden unter vier verschiedenen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

3.7 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse

Prinzip. Restriktionsenzyme sind sequenzspezifische Endonukleasen. Der Austausch eines einzelnen Nukleotids in der DNA-Sequenz kann zum Entstehen oder zum Wegfall einer Erkennungsstelle eines Restriktionsenzyms und somit zur Entstehung unterschiedlich großer Fragmente nach Enzymverdau führen. Nach der PCR wird das Amplifikat mit dem entsprechenden Restriktionsenzym inkubiert. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung zeigt ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster in Form von zusätzlichen oder fehlenden Banden, wenn durch eine genetische Alteration eine Schnittstelle entsteht bzw. zerstört wird.
Den Analysen liegt die TNF-α-DNA Sequenz HUMTNFAB (Gen Bank accession number M16441) zugrunde.

Aliquots von 5 µl des Amplifikates und 5 µl Enzymansatz - dieser bestehend aus 95 µl 1x Reaktionspuffer NEB3 bzw. NEB4 und 5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) - wurden in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und in einem Thermocycler für 5 h bei 37°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte wie in 3.4.3 beschrieben.

TNF2-Allel:

5'-ggactcagct ttctgaagcc cctcccagttc tagttctatc tttttcctgc atcctgtctg gaagttagaa ggaaacaga ccacagacc tg♦gtccccaa aagaaatgga ggcaataggt tttgaggggc atg[G]♦ggacgg ggttcagcct ccagggtcct acacacaaat cagtca-3'

Tab.6: Nukleotidsequenz des TNF2-Allels an Position -308
Unterstrichen: Primer; eckige Klammer: AP2-Allel; ♦: Schnittstelle des Restriktionsenzyms

homozygot		heterozygot		Wildtyp	
91	bp	91	bp	91	bp
84	bp	84	bp		
		42	bp	42	bp
		42	bp	42	bp

Tab.7: Fragmentlängen des AP2-Allels nach Verdau mit Sau96 I

TNF3-Allel:

5'-caggcctcag gactcaacac agcttttccc tccaacccgt tttctctccc tcaacggact cagctttctg aagcccctcc cagttctagt tctatctttt tcctgcatcc tgtctggaag ttagaaggaa acagaccaca gacctg♦gtcc ccaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag gggcatgggg acggggttca gcctccagg♦g tcctacacac aaatcagtca gtggcccaga agaccccct cggaatc[G]♦gagcagggagga tggggagtgt ga-3'

Tab.8: Nukleotidsequenz des TNF3-Allels an Position -238
Unterstrichen: Primer; eckige Klammer: AP3-Allel; ♦: Schnittstelle des Restriktionsenzyms

homozygot		heterozygot		Wildtyp	
146	bp	146	bp	146	bp
73	bp	73	bp		
63	bp	63	bp	63	bp
		49	bp	49	bp
		24	bp	24	bp

Tab.9: Fragmentlängen des AP3-Allels nach Verdau mit Ava II

AP4-Allel:

5'-caggcctcag gactcaacac agcttttccc tccaacccgt tttctctccc tcaacggac♦t cagctttctg aagcccctcc cagttctagt tctatctttt tcctgcatcc tgtctggaag ttagaaggaa acagaccaca gacctggtcc ccaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag gggcatgggg acggggttca gcctccaggg tcctacacac aaatcagtca gtggcccaga agacccccc♦t c[G]gaatcgga gcagggagga tggggagtgt ga-3'

Tab.10: Nukleotidsequenz des TNF4-Allels an Position -244
Unterstrichen: Primer; eckige Klammer: AP2-Allel; ♦: Schnittstelle des Restriktionsenzyms

homozygot	heterozygot	Wildtyp
	223 bp	223 bp
190 bp	190 bp	
59 bp	59 bp	59 bp
33 bp	33 bp	

Tab.11: Fragmentlängen des AP4-Allels nach Verdau mit Dde I

3.8 Software

Die RFLP-Analysen wurden mit Hilfe der Software Tetra Analyze unterstützt. Die Sequenzierungs-Analyse erfolgte mittels des ABI Prism Programms (Version 1.2.1).

3.9 Statistik

Für die statistische Datenanalyse wurde die Software Microsoft Excel 98 verwendet. Alle Daten wurden in Kalkulationstabellen als einzelne Variablen erfaßt.

Die quantitativen Daten wurden als Mittelwerte±Standardabweichung (MW±SD) angegeben. Die Beschreibung der Stärke der linearen statistischen Beziehung zwischen zwei ausgewählten Variablen erfolgte durch den Fisher's Exakt Test nach Bonferroni-Korrektur, das Signifikanzniveau (p-Wert) wurde als < 0,005 definiert. Der 2-Tail p-Wert wurde nach Agresti (1992) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 SSCP

4.1.1 Screening nach Polymorphismen im TNF-α-Gen mittels SSCP

Um den gesamten kodierenden Bereich, einschließlich der Exon-Intron-Grenzen sowie die Promotorregion des TNF-α-Gens auf bisher unbekannte genetische Variationen zu untersuchen, wurde das Gen bei 92 gesunden Kontrollpersonen einer SSCP-Analyse unterzogen.

In den analysierten Abschnitten konnte mit Ausnahme des Promotorfragments 2 kein auffälliges Wanderungsverhalten in der Elektrophorese beobachtet werden. Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen, in wieweit sich die untersuchten Abschnitte durch die SSCP-Analyse unterschiedlich darstellen ließen.

4.1.2 Vergleich der SSCP Produkte

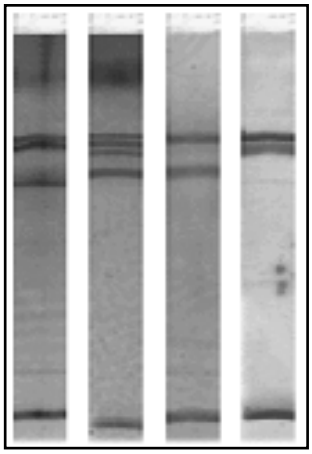

Abb.1: SSCP-Darstellung der Promotorabschitte des TNF-α von links nach rechts: Promotor-abschnitt 1, 2, 3 und 4

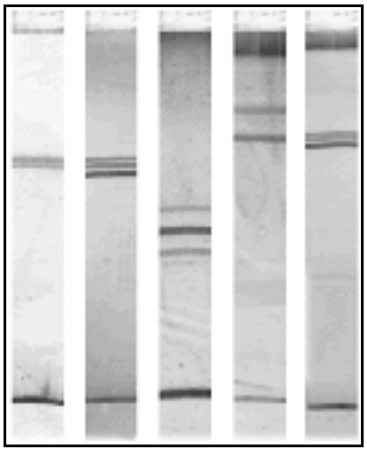

Abb.2: SSCP-Darstellung der Exonabschitte des TNF-α von links nach rechts: Exon 1, 2, 3, 4.1 und 4.2

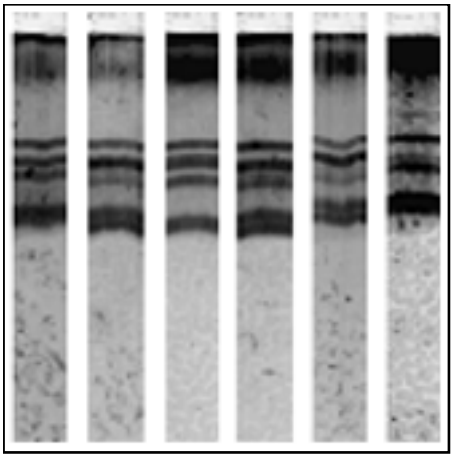

Abb.3: SSCP-Darstellung des
Promotorabschnitts 2
mit verschiedenen Variationen

4.2 RFLP

Um die häufigsten Promotorpolymorphismen im TNF-α-Gen zu identifizieren, wurden Mutageneseprimer konstruiert, die die Unterscheidung der Allele mittels Restriktionsenzymen erlaubten. Die Untersuchungen wurden an der DNA 251 HIV-positiver Patienten sowie an 211 gesunden Kontrollprobanden durchgeführt. Die Korrektheit der RFLP-Analyse wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt. Mittels PCR wurden Fragmente von 175 bp (-308 bzw. AP2) und 282 bp (-238 bzw. AP3 und -244 bzw. AP4) Länge amplifiziert. In den folgenden Abbildungen werden die verschiedenen Alleltypen dargestellt. Zur Kontrolle der Elektrophorese sowie des PCR-Produktes wurde das unverdaute PCR-Produkt aufgetragen. Die Ziffern am linken Bildrand beschreiben die Länge der einzelnen Fragmente in bp.

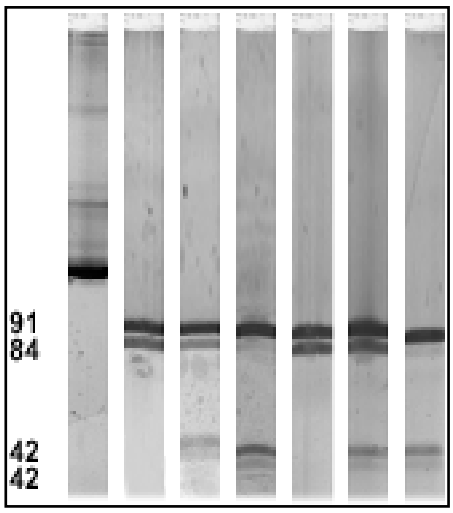

Abb.4: RFLP-Darstellung des AP2-Allels
von links nach rechts: PCR-Produkt,
Homozygoter, Heterozygoter, Wildtyp,
Homozygoter, Heterozygoter, Wildtyp

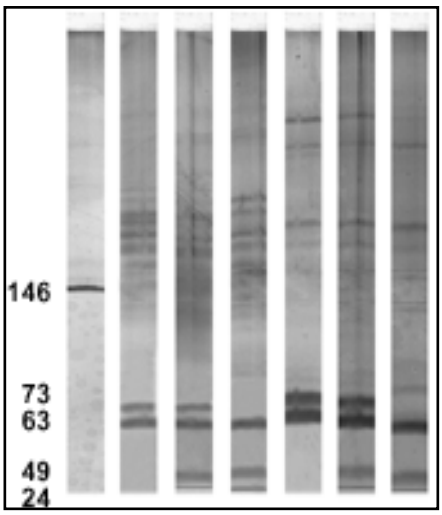

Abb.5: RFLP-Darstellung des AP3-Allels
von links nach rechts: PCR-Produkt,
Homozygoter, Heterozygoter, Wildtyp,
Homozygoter, Heterozygoter, Wildtyp

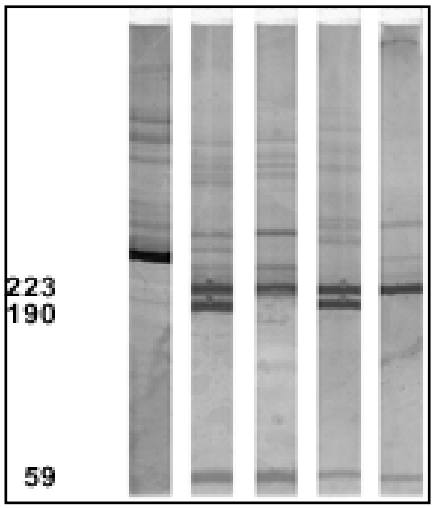

Abb.6: RFLP-Darstellung des AP4-Allels
von links nach rechts: PCR-Produkt,
Heterozygoter, Wildtyp, Hetero-
zygoter, Wildtyp

4.3 Sequenzierung

Um zu zeigen, daß die restriktionsenzymatische Analyse korrekt war, wurden einzelne selektionierte Proben mittels DNA-Sequenzierung überprüft. In sämtlichen Fällen wurde das Ergebnis der RFLP-Analyse bestätigt.

In den folgenden Abbildungen ist beispielhaft das Elektropherogramm des AP3-Allels (Wildtyp und heterozygote Variation) dargestellt.

4.3.1 Darstellung des AP3-Allels (-238)

Sequenzierungselektropherogramme der Basentransition an Position -238.

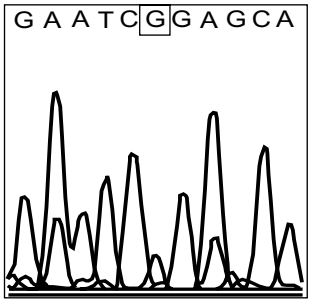

Abb.7: Sequenzierung des AP3-Allels, Wildtyp
Darstellung in Richtung 5'-3'

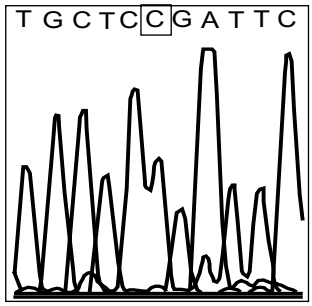

Abb.8: Sequenzierung des AP3-Allels, Wildtyp
Darstellung in Richtung 3'-5'

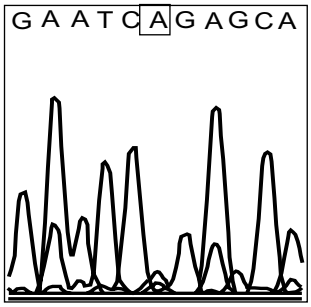

Abb.9: Sequenzierung: AP3-Allel, heterozygot
Darstellung in Richtung 5'-3'.

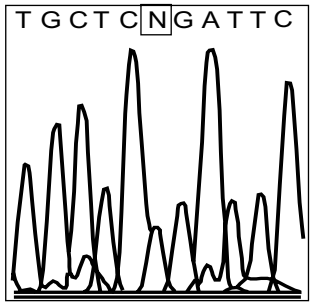

Abb.10: Sequenzierung: AP3-Allel, heterozygot
Darstellung in Richtung 3'-5'.

5 Statistische Auswertung

Es wurden 251 HIV-positive Patienten und 211 gesunde Kontrollprobanden mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus auf die Promotorallele AP1, AP2, AP3 und AP4 des TNF-α-Gens untersucht. In der Gruppe der HIV-Patienten lag bei 150 (59,8%) der Wildtyp (1/1) des Promotors vor. Bei den untersuchten 211 Kontrollen fand sich bei 132 (62,6%) der Wildtyp.

	HIV Patienten		Kontrollkollektiv		
TNF-Allele	n	%	n	%	p-Wert
TNF 1/1	150	(59,8)	132	(62,6)	0,56628
TNF 2/1	51	(20,3)	52	(24,6)	0,31260
TNF 3/1	24	(9,6)	12	(5,7)	0,16273
TNF 4/1	6	(2,4)	3	(1,4)	0,51841
TNF 2/2	11	(4,4)	3	(1,4)	0,09949
TNF 2/3	1	(0,4)	4	(1,9)	0,18321
TNF 2/4	2	(0,8)	1	(0,5)	1
TNF 3/3	1	(0,4)	1	(0,5)	1
TNF 3/4	5	(2,0)	3	(1,4)	0,73245
TNF 4/4	0	(0,0)	0	(0,0)	1
Summe	251	(100,0)	211	(100,0)	

Tab.12: Übersicht über die Kollektive und die Verteilung der Allele
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

5.1 Allelfrequenzen

Wildtyp: Die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant in den untersuchten Kollektiven: Der Wildtyp war bei 132 (62,6%) Probanden des Kontrollkollektivs zu finden, im HIV-Kollektiv lag er bei 150 (59,8%) Patienten vor.

Das in dieser Studie untersuchte Kontrollkollektiv zeigte für das heterozygote Vorkommen des TNF2-Allels eine Häufigkeit von 57 (27,0%), im homozygoten Zustand kam das Allel bei 3 (1,4%) vor. Die Ergebnisse des HIV-Kollektivs wichen von denen der Kontrollen nicht signifikant ab und zeigten bei 54 (21,5%) Patienten das heterozygote AP2-Allel und bei 11 (4,4%) Patienten die homozygote Form. Die

korrespondierende Allelfrequenz des TNF2-Allels betrug 14,9% im Kontrollkollektiv und 15,1% im HIV-Kollektiv. Diese Daten entsprechen den nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Häufigkeiten.

Das gesunde Kollektiv zeigte für das heterozygote Vorkommen des TNF3-Allels eine Häufigkeit von 19 (9,0%), im homozygoten Zustand kam das Allel bei 1 (0,5%) Probanden vor. Die Ergebnisse des HIV-Kollektives wichen von denen der Kontrollen nicht signifikant ab und zeigten bei 30 (12,0%) Patienten das heterozygote AP3-Allel und bei 1 (0,4%) Patienten den homozygoten Zustand. Die korrespondierende Allelfrequenz des TNF3-Allels betrug 5,0% im Kontrollkollektiv und 6,4% im HIV-Kollektiv. Diese Daten entsprechen den nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Häufigkeiten (s. Tab. 2 und 3).

Das untersuchte Kontrollkollektiv zeigte für das heterozygote Vorkommen des TNF4-Allels eine Häufigkeit von 7 (3,3%). Die Ergebnisse des HIV-Kollektivs wichen von denen der Kontrollen nicht signifikant ab und zeigten Werte von 13 (5,2%) für das heterozygote AP4. Das homozygote TNF4-Allel wurde in keinem der beiden Kollektive gefunden. Die korrespondierende Allelfrequenz des TNF4-Allels betrug 1,7% im Kontrollkollektiv und 0,7% im HIV-Kollektiv. Diese Daten entsprechen ebenfalls den nach dem Hardy-Weinberg Gesetz erwarteten Häufigkeiten.

5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In der Gesamtverteilung der Allele lagen beide untersuchten Kollektive im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

5.2.1 Kontrollkollektiv

		AP2	AP3	AP4
Genotyp	AA homozygot	3	1	0
	Aa heterozygot	57	19	7
	aa Wildtyp	151	191	204
	Summe	211	211	211
	p	0,149	0,050	0,017
	q	0,851	0,950	0,983
berechnet	p^2	0,022	0,003	0,003
	2pq	0,254	0,095	0,033
	q^2	0,724	0,903	0,966
beobachtet	p^2	0,014	0,005	0,000
	2pq	0,270	0,090	0,033
	q^2	0,716	0,905	0,967

Tab.13: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: Kontrollkollektiv
AA = Anzahl der Homozygoten für das entsprechende Allel, Aa = Anzahl der Heterozygoten, aa = Anzahl der Probanden, die das entsprechende Allel nicht aufweisen (Wildtyp), p = Frequenz des Allels (AP2, AP3 oder AP4), q = Frequenz der restlichen Allele

5.2.2 HIV-Kollektiv

		AP2	AP3	AP4
Genotyp	AA homozygot	11	1	0
	Aa heterozygot	54	30	13
	aa Wildtyp	186	220	238
	Summe	251	251	251
	p	0,151	0,064	0,026
	q	0,849	0,936	0,974
berechnet	p^2	0,023	0,004	0,007
	2pq	0,256	0,119	0,051
	q^2	0,720	0,876	0,949
beobachtet	p^2	0,044	0,004	0,000
	2pq	0,215	0,120	0,052
	q^2	0,741	0,876	0,948

Tab.14: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: HIV-Kollektiv
AA = Anzahl der Homozygoten für das entsprechende Allel, Aa = Anzahl der Heterozygoten, aa = Anzahl der Probanden, die das entsprechende Allel nicht aufweisen (Wildtyp), p = Frequenz des Allels (AP2, AP3 oder AP4), q = Frequenz der restlichen Allele

5.3 Geschlechtsverteilung

5.3.1 Kontrollkollektiv

Die Verteilung der Geschlechter in beiden Kollektiven in Bezug auf die Verteilung der Genotypen ist in den folgenden Tabellen dargestellt. Das Kontrollkollektiv teilt sich in 96 (45,5%) weibliche und 77 (36,5%) männliche Teilnehmer. Bei 38 (18,0%) der Teilnehmer war das Geschlecht in der retrospektiv erhobenen, anonymen statistischen Analyse nicht mehr zu ermitteln.

	gesamt		Männer	Frauen	
TNF-Allele	n	%	n	n	p-Wert
TNF 1/1	105	(60,7)	46	59	0,25991
TNF 2/1	45	(26,0)	20	25	1
TNF 3/1	9	(5,2)	6	3	0,18907
TNF 4/1	2	(1,2)	0	2	0,50316
TNF 2/2	3	(1,7)	1	2	1
TNF 2/3	4	(2,3)	3	1	0,32456
TNF 2/4	1	(0,6)	0	1	1
TNF 3/3	1	(0,6)	0	1	1
TNF 3/4	3	(1,7)	1	2	1
TNF 4/4	0	(0)	0	0	1
Summe	173	(100,0)	77	96	

Tab.15: Geschlechterverteilung im Kontrollkollektiv
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

5.3.2 HIV-Kollektiv

Das aus 251 Teilnehmern bestehende Patientenkollektiv teilt sich auf in 188 (74,9%) männliche, 56 (22,3%) weibliche Teilnehmer und 7 (2,8%) Teilnehmer, für die keine Angabe zum Geschlecht vorliegt.

	gesamt		Männer	Frauen	
TNF-Allele	n	%	n	n	p-Wert
TNF 1/1	147	(60,2)	116	31	0,43794
TNF 2/1	51	(20,9)	39	12	1
TNF 3/1	22	(9,0)	14	8	0,18014
TNF 4/1	5	(2,0)	2	3	0,08099
TNF 2/2	11	(4,5)	10	1	0,46459
TNF 2/3	0	(0)	0	0	1
TNF 2/4	2	(0,8)	2	0	1
TNF 3/3	1	(0,4)	1	0	1
TNF 3/4	5	(2,0)	4	1	1
TNF 4/4	0	(0)	0	0	1
Summe	244	(100,0)	188	56	

Tab.16: Geschlechterverteilung im HIV-Kollektiv
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

5.4 Infektionsweg

Nach anamnestischen Angaben wurden die Patienten hinsichtlich des Infektionsweges in sieben Gruppen eingeteilt. Die Tabelle zeigt die Aufschlüsselung der einzelnen TNF-α-Promotorallele nach dem Infektionsmodus.

TNF-Allele		unklarer Infektionsweg		homosexuelle Kontakte		intravenöser Drogenabusus	
	n	n	p-Wert	n	p-Wert	n	p-Wert
TNF 1/1	150	45	0,60321	45	0,78786	36	0,65632
TNF 2/1	51	17	0,87431	15	0,37556	10	0,71556
TNF 3/1	24	8	1	2	0,08343	8	0,33696
TNF 4/1	6	3	0,45578	1	1	1	1
TNF 2/2	11	2	0,74121	7	0,14077	2	1
TNF 2/3	1	1	0,42552	0	1	0	1
TNF 2/4	2	1	0,56521	1	0,53633	0	1
TNF 3/3	1	1	0,42552	0	1	0	1
TNF 3/4	5	2	0,67713	2	0,65736	0	0,58835
TNF 4/4	0	0	1	0	1	0	1
Summe	251	80		73		57	

Tab.17: Infektionsmodus
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

TNF-Allele		heterosexuelle Kontakte		bisexuelle Kontakte		Endemie-patient		Blutprodukte/ -transfusionen	
	n	n	p-Wert	n	p-Wert	n	p-Wert	n	p-Wert
TNF 1/1	150	13	0,81330	7	1	3	0,44740	1	1
TNF 2/1	51	5	0,57467	2	1	2	0,63513	0	1
TNF 3/1	24	1	1	2	0,33649	2	0,14965	1	0,18822
TNF 4/1	6	0	1	1	0,28164	0	1	0	1
TNF 2/2	11	0	1	0	1	0	1	0	1
TNF 2/3	1	0	1	0	1	0	1	0	1
TNF 2/4	2	0	1	0	1	0	1	0	1
TNF 3/3	1	0	1	0	1	0	1	0	1
TNF 3/4	5	1	0,37153	0	1	0	1	0	1
TNF 4/4	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Summe	251	20		12		7		2	

Tab.18: Infektionsmodus
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

5.5 Analyse der Determinaten des klinischen Verlaufs

5.5.1 CD4-positive T-Lymphozyten

Das Verhalten der CD4-positiven T-Lymphozyten während des Krankheitsverlaufes diente der Beurteilung der Krankheitsprogression. Zur statistischen Analyse wurden die Patienten in Anlehnung an Steward und Mitarbeiter (1997) nach ihrem CD4-Zellverhalten in vier Gruppen eingeteilt.

Zur Gruppe der Patienten mit beschleunigter Progression (RP, rapid progressors) wurden diejenigen zusammengefaßt, die einen CD4-Zellabfall von über 100 Zellen/µl/ Jahr aufwiesen. Dieser Abfall mußte über 24 Monate konstant sein. Patienten mit einem Zellverlust von ≥50 Zellen/µl/Jahr bilden die zweite Gruppe, eine weitere Gruppe stellten Patienten mit einem Zellabfall von weniger als 50 Zellen/µl/Jahr dar. Die Gruppe der Langzeitüberlebenden (LTNP, long-term non-progressors) bildeten Patienten, die seit über 8 Jahren HIV-positiv waren, sich noch nicht im AIDS-Stadium

befanden, keiner antiretroviralen Therapie bedurften und deren CD4-positive T-Lymphozyten über 500/µl lagen.

Bei 191 (76,1%) der 251 molekulargenetisch untersuchten Patienten lagen die Daten für eine sichere Analyse des CD4-Verlaufs vor. Die folgende Tabelle teilt die Patienten in obengenannte Gruppen ein und stellt den p-Wert des Fisher's Exakt Tests jedes einzelnen Allels dar.

		RP		≥50 Zellen p.a.	
TNF-Allele	n	n	p-Wert	n	p-Wert
TNF 1/1	115	7	0,15474	86	1
TNF 2/1	39	1	1	27	0,78206
TNF 3/1	16	0	1	12	1
TNF 4/1	3	0	1	2	1
TNF 2/2	10	0	1	9	0,81212
TNF 2/3	0	0	1	0	1
TNF 2/4	2	0	1	2	1
TNF 3/3	1	0	1	1	1
TNF 3/4	4	0	1	4	0,72836
TNF 4/4	0	0	1	0	1
Summe	191	8		143	

Tab.19: CD4-Zellverlauf
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

		<50 Zellen p.a.		LTNP	
TNF-Allele	n	n	p-Wert	n	p-Wert
TNF 1/1	115	18	0,70008	5	1
TNF 2/1	39	11	0,10684	0	0,35933
TNF 3/1	16	1	0,47813	3	0,03059
TNF 4/1	3	1	0,46428	0	1
TNF 2/2	10	1	1	0	1
TNF 2/3	0	0	1	0	1
TNF 2/4	2	0	1	0	1
TNF 3/3	1	0	1	0	1
TNF 3/4	4	0	1	0	1
TNF 4/4	0	0	1	0	1
Summe	191	32		8	

Tab.20: CD4-Zellverlauf
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

5.5.2 Zeitliche Progression der HIV-Krankheit

Die Progression der Krankheit wurde bei 21 Patienten anhand der Zeitdauer zwischen dem ARC-Stadium und dem AIDS-Stadium beurteilt. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der durchlebten Monate errechnet.

		Zeitraum in Monaten		
TNF-Allele	n	Median	MW	SD
TNF 1/1	10	24	31	27,0
TNF 2/1	7	47	47	30,0
TNF 3/1	3	31	43	24,2
TNF 4/1	1	39	39	0

Tab.21: Zeitraum von ARC bis AIDS
in Monaten (Median, MW±SD)

5.5.3 Wasting Syndrom und HIV-Enzephalopathie

Zur Betrachtung der verschiedenen Verlaufsformen der HIV-Krankheit kamen das Auftreten spezifischer, HIV-assoziierter Krankheiten wie das Wasting Syndrom und die HIV-Enzephalopathie in Frage. In dem untersuchten HIV-Kollektiv wiesen 21 (8,4%) Patienten das Wasting Syndrom auf. Eine andere Gruppe, ebenfalls aus 21 (8,4%) Patienten bestehend, zeigte im fortgeschrittenen Stadium die Zeichen der HIV-Enzephalopathie. Die Gruppe der Patienten mit Wasting Syndrom bzw. mit HIV-Enzephalopathie werden in getrennten Tabellen neben der Verteilung der Genotypen im Gesamtkollektiv aufgelistet und mit Hilfe des Fisher's Exakt Testes untersucht.

	gesamt		Wasting Syndrom		
TNF-Allele	n	%	n	%	p-Wert
TNF 1/1	150	(59,8)	12	(57,1)	0,82068
TNF 2/1	51	(20,3)	4	(19,0)	1
TNF 3/1	24	(9,6)	3	(14,3)	0,44864
TNF 4/1	6	(2,4)	0	(0)	1
TNF 2/2	11	(4,4)	2	(9,5)	0,26469
TNF 2/3	1	(0,4)	0	(0)	1
TNF 2/4	2	(0,8)	0	(0)	1
TNF 3/3	1	(0,4)	0	(0)	1
TNF 3/4	5	(2,0)	0	(0)	1
TNF 4/4	0	(0)	0	(0)	1
Summe	251	(100)	21	(100)	

Tab.22: Wasting Syndrom
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

	gesamt		HIV-Enzephalopathie		
TNF-Allele	n	%	n	%	p-Wert
TNF 1/1	150	(59,8)	14	(66,7)	0,64535
TNF 2/1	51	(20,3)	3	(14,3)	0,77554
TNF 3/1	24	(9,6)	1	(4,8)	0,70402
TNF 4/1	6	(2,4)	1	(4,8)	0,42776
TNF 2/2	11	(4,4)	1	(4,8)	1
TNF 2/3	1	(0,4)	0	(0,0)	1
TNF 2/4	2	(0,8)	1	(4,8)	0,21493
TNF 3/3	1	(0,4)	0	(0,0)	1
TNF 3/4	5	(2,0)	0	(0,0)	1
TNF 4/4	0	(0,0)	0	(0,0)	1
Summe	251	(100,0)	21	(100,0)	

Tab.23: HIV-Enzephalopathie
Fisher's Exakt Test (2-Tail) nach Bonferroni-Korrektur (p= 0,005)

6 Diskussion

Die Infektion mit HIV und die Progression der Erkrankung wird zum einen durch Virulenzfaktoren des Virus beeinflußt *(Liu et al. 1997, Luoie et al. 1991)*. In den letzten Jahren konnte zudem gezeigt werden, daß genetische Dispositionsfaktoren des Wirtes einen bedeutenden Einfluß auf die Krankheitsprogression bei Infektionskrankheiten ausüben. So konnten genetische Alterationen humaner Chemokinrezeptoren, welche zu einem modifizierten viralen Bindungsverhalten an die Wirtszelle führen, mit einer vermehrten Resistenz oder einem protrahierten Krankheitsverlauf der HIV-Infektion assoziiert werden *(Samson et al. 1996, Paxton et al. 1996, Liu R. et al. 1996, Smith et al. 1997)*.

TNF-α nimmt bei der HIV-Infektion eine zentrale Rolle ein *(Haynes et al. 1996)*: Das tat-Protein des HI-Virus induziert über die Aktivierung des humanen Transkriptionsfaktors NF-κB und Bindung desselben an die LTR-Region des Virus nicht nur seine eigene Replikation, sondern auch über den gleichen Mechanismus die Transkription von TNF-α *(Chen et al. 1997 und Nath et al. 1999)*. TNF-α wiederum potenziert die HIV-Replikation durch Induktion von NF-κB. Im weiteren gibt es Hinweise, daß TNF-α bei der Genese oder der Ausprägung HIV-assoziierter Erkrankungen pathophysiologisch involviert ist. Bei der HIV-Enzephalopathie korreliert der Schweregrad der neurologischen Beteiligung mit der mRNA-Konzentration des TNF-α im Liquor cerebrospinalis *(Mayne et al. 1998)*. Auch beim HIV-Wasting Syndrom ist die Konzentration an TNF-α im Blut signifikant erhöht *(Suttmann et al. 1994)*.

Bei mehreren Infektionskrankheiten konnten Assoziationen zwischen Krankheitsverlauf und TNF-α-Polymorphismen identifiziert werden. So ist bei Malaria das AP2-Allel mit einem erhöhten Risiko für zerebrale Komplikationen assoziiert *(Kwiatkowski et al. 1990, McGuire et al. 1994)*, aber auch bei mukokutaner Leishmaniasis, Lepra oder Meningokokkeninfektionen wurden derartige Assoziationen beschrieben *(Cabrera et al. 1995, Nadel et al. 1996, Roy et al. 1997)*.

Aus diesen Gründen wurde der Frage nachgegangen, in wieweit Polymorphismen im TNF-α Gen einen modulierenden Einfluß auf die Krankheitsprogression oder die

Entstehung bzw. Ausprägung HIV-assoziierter Erkrankungen wie dem Wasting Syndrom oder der HIV-Enzephalopathie haben. Hierfür wurden die Promotorregion (Position -570 bis 0) sowie die kodierenden Sequenzen des TNF-α-Gens bei 92 gesunden Probanden mittels SSCP-Analyse, basierend auf der von Nedwin et al. (1985) publizierten Sequenz, auf genetische Variationen untersucht.

Die restriktionsenzymatische Analyse im Promotorbereich von -495 bis -214 des TNF-α-Gens erfolgte bei 251 HIV-positiven Patienten und 211 gesunden Kontrollprobanden, mit dem Ziel der Charakterisierung der häufigsten Promotorpolymorphismen (-308G>A (AP2), -238G>A (AP3) und -244G>A (AP4)). Mittels PCR wurden drei Fragmente in einer Größenordnung von 175 und 282 bp Länge amplifiziert und durch Restriktionsenzymverdau analysiert. Die Auswahl der synthetisierten Mutageneseprimer erfolgte nach vorheriger Analyse verschiedener Primerkombinationen. Die synthetisierten Primer führten bei vorhandenem Dimorphismus zu der Entstehung oder dem Wegfall einer Restriktionsschnittstelle, die durch das Enzym erkannt und spezifisch geschnitten wurden, was zu der hohen Sensitivität und Spezifität der Methode beiträgt. Zur Kontrolle der RFLP-Ergebnisse erfolgte eine DNA-Fluoreszenzsequenzierung an ausgewählten Proben. Die Sequenzierung bestätigte die Korrektheit der Amplifikation sämtlicher SSCP-Fragmente. Bei den polymorphen Allelen handelte es sich in allen Fällen um eine singuläre Basentransition von Guanin zu Adenin.

6.1 Allelfrequenzen

In dem untersuchten Studienkollektiv unterschieden sich die Allelfrequenzen des Wildtyps (AP1) nicht signifikant von dem untersuchten Kontrollkollektiv. Diese Daten stimmten überein mit den in der Literatur genannten Ergebnissen von Hamann et al. (1995) und Verduyn et al. (1993).

Die Häufigkeit des AP2-Allels in dem von uns untersuchten gesunden Kontrollkollektiv lag bei 14,2% (13,5% in heterozygotem und 0,7% in homozygotem Zustand) und im HIV-Kollektiv bei 12,9% (10,7% in heterozygotem und 2,2% in homozygotem Zustand). Hiervon unterscheiden sich die Daten von Brinkmann et al. (1997): Die Arbeitsgruppe untersuchte 115 gesunde Kontrollprobanden und 144 HIV-positive

Patienten, wonach in der gesunden Gruppe bei 24% gegenüber 16,7% im HIV-Kollektiv das AP2-Allel gefunden wurde. Knuchel et al. untersuchten 196 HIV-positive Patienten, von denen 1,5% homozygot und 22% heterozygot für das AP2-Allel waren *(Knuchel et al. 1998)*. Eine mögliche Ursache für die Differenz der Allelfrequenzen könnte in der Auswahl der Kollektive liegen, da Knuchel et al. ein Kollektiv untersuchten, das ausschließlich aus langzeitüberlebenden männlichen Studienteilnehmern bestand. Zum anderen kann die Differenz auch durch die geringere Zahl der untersuchten Individuen bedingt sein.

Die Häufigkeit des AP3-Allels lag in dem von uns untersuchten gesunden Kontrollkollektiv bei 4,7% (4,5% in heterozygotem und 0,2% in homozygotem Zustand) und im HIV-Kollektiv bei 6,2% (6,0% heterozygote und 0,2% homozygote Patienten). Hamann et al. berichten von Allelfrequenzen von 5,3% für das AP3-Allel in ihrer Kontrollpopulation (1995). In dem von D'Alfonso und Richiardi (1994) untersuchten Kollektiv lag die Allelfrequenz bei 7,0%. Neben dem AP3-Allel konnte an Position -376 die Existenz eines weiteren Polymorphismus bestätigt werden. Über die Koppelung der beiden Allele kann aus den vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden, jedoch beschreiben Hamann und Knight (1999) eine absolute Koppelung des AP3-Allels an den Polymorphismus an Position -376. Die Arbeitsgruppe um Brinkmann konnte durch ihre Analyse diese jedoch nicht stützen (1997).

Die Häufigkeit im untersuchten Kontrollkollektiv lag für das AP4-Allel bei 1,7% (1,7% in heterozygotem Zustand, keine Homozygoten) und bei 2,6% im Patientenkollektiv (2,6% heterozygote Patienten, keine Homozygoten). In der recherchierten Literatur konnten keine Hinweise zu Allelfrequenzen des AP4-Allels gefunden werden.

6.2 Zeitliche Progression der Krankheit

Die Serokonversion ist Ausdruck der Entwicklung der Immunantwort gegen das HI-Virus, weshalb sie einen bedeutenden Zeitpunkt darstellt, um bei Fortschreiten der Krankheit retrospektiv Aussagen über den Verlauf und die Progression der Krankheit machen zu können. Mit Ausnahme von prospektiven Studien kommt bei der Großzahl der HIV-Patienten als ein früher, ärztlich dokumentierter Zeitpunkt die Diagnose des

AIDS Related Complex (ARC) in Betracht, da sich zu diesem Zeitpunkt Symptome bereits bemerkbar machen und der Patient sich in Behandlung begibt. Die auf diese Weise erhobene Diagnose stellt, ebenso wie die des AIDS-Stadiums, einen zuverlässigen Zeitpunkt dar.
Da in dem untersuchten Patientenkollektiv der Zeitpunkt der Serokonversion nicht bekannt war, wurden für die Beurteilung der Progression das Diagnosedatum des AIDS Related Complex und das des Acquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS) zur Hilfe genommen.

Bei 21 Patienten (8,4%) lagen die Diagnosedaten für ARC und AIDS vor. Die statistische Untersuchung zeigte keine Assoziation eines bestimmten Genotyps mit der Zeitdauer von ARC zu AIDS. In der untersuchten Literatur wurden keine Angaben dieser Art gefunden. Es ist kritisch anzumerken, daß dieses Verfahren keine gängige Methode zur Beurteilung der Progression darstellt, jedoch boten sich im Rahmen von retrospektiven Studien zur Krankheitsprogression der HIV-Infektion bei unbekanntem Serokonversionszeitpunkt nur diese Daten zur Analyse an.

6.3 CD4-Zellen

Die CD4-Zellen stellen einen validen Surrogatmarker der Infektionsaktivität und des aktuellen zellulären Immunstatus bei der HIV-Infektion dar. Der zugrundeliegende Pathomechanismus des Zelluntergangs dieser Zellgruppe ist nicht vollständig geklärt. Einerseits führen direkte zytotoxische Effekte des HI-Virus zum Untergang der CD4-Zellen *(Garry et al. 1989)*, es kommt aber auch durch eine wirtseigene Induktion zur Apoptose, sobald sich infizierte Zellen aus dem peripheren Blut in die Lymphknoten zurückziehen *(Chen et al. 1999)*. Die durch TNF-α vermittelte Apoptose *(Klein et al. 1996)* verhindert, daß das infektiöse Agens wie auch zytotoxische intrazelluläre Komponenten freigesetzt werden. Dieser effektive Mechanismus zur Eliminierung des Virus wird wirkungsvoll umgangen, da es trotz beschriebener Apoptose zu einer Infektion und persistierenden Vermehrung des HIV in myeloiden Zellen, insbesondere Monozyten und Makrophagen, kommt.

Da es bei der Beurteilung des CD4-Zellverlaufes keine anerkannten, allgemein gültigen Definitionen zur Abgrenzung einzelner Verlaufsgruppen gibt und in der Regel

der Zeitpunkt der Infektion bzw. der Serokonversion nicht bekannt ist, wurden die Patienten in Anlehnung an Steward et al. (1997) in vier Kategorien eingeteilt .
In dem untersuchten Kollektiv erfüllten 7 Patienten (3,6%) die Kriterien der Langzeitüberlebenden (LTNP). Pantaleo spricht in diesem Zusammenhang von ca. 5% in einer 1995 veröffentlichten Studie des NIAID. In dem von Petrucci et al. (1997) untersuchten Kollektiv befanden sich zwischen 2 und 4% Langzeitüberlebende (in Abhängigkeit von der angewandten Definition). Zwei weitere Arbeitsgruppen machten Angaben zwischen 1 und 5% bezüglich der Häufigkeit dieser Gruppe *(Buchbinder et al. 1994, Keet et al. 1994)*. Durch neue Entwicklungen in der Therapie der HIV-Krankheit veränderten sich die Anforderungen an die Definition dieser Patientengruppe. Daraus ergab sich, daß Buchbinder et al. (1999) nur Patienten in die Gruppe der LTNP aufnahm, die seit mindestes 10 Jahren HIV-positiv waren, dabei hohe Werte der CD4-Zellen bei gleichzeitig niedriger Viruslast hatten und keinerlei Therapie benötigten. Der Faktor Viruslast wurde bei älteren Definitionen nicht berücksichtigt, da er eine neuere Methode zur Beurteilung der HIV-Krankheit darstellt. Es ist denkbar, daß in Zukunft erst dann von Langzeitüberlebenden gesprochen wird, wenn die Patienten seit mehr als 15 oder auch 20 Jahren HIV-positiv, immunologisch stabil und klinisch gesund sind.

Die Kriterien der beschleunigten Progression hinsichtlich des CD4-Zellverlaufes trafen in dem von uns untersuchten HIV-positiven Kollektiv bei 7 (3,6%) Patienten zu. Vergleichbare Zahlen zur Häufigkeit dieser Patientengruppe konnten in der analysierten Literatur nicht gefunden werden. Petrucci und Mitarbeiter (1997) berechneten bei einem Patientenkollektiv mit bekanntem Serokonversionszeitpunkt einen medianen Zellverlust von 84 CD4-Zellen/Jahr. Trotz unterschiedlicher Ansätze der Kriterien - einerseits die klinisch gestellte Diagnose im untersuchten Kollektiv und auf der anderen Seite die mit bekanntem Serokonversionszeitpunkt erhobenen Daten von Petrucci und Mitarbeitern - stimmten beide Ergebnisse sehr gut überein.

In Hinblick auf den CD4-Zellverlust konnte bei 32 (18,3%) Patienten ein Verlust von weniger als 50 Zellen/Jahr beobachtet werden, wohingegen 143 (81,7%) der Patienten einen Zellverlust von über 50/Jahr aufwiesen. Diese Daten entsprachen der

klinischen Erfahrung, wonach beim typischen Verlauf der HIV-Erkrankung jährlich über 50 Zellen untergehen.

Bei keiner der genannten vier Gruppen des CD4-Zellverlustes fand sich eine signifikante Assoziation zu den einzelnen TNF-α-Promotorallelen. Unser Ergebnis stand in Einklang mit denen von Knuchel und Mitarbeitern (1998) erhobenen Daten, die bei 32 Langzeitüberlebenden das AP2-Allel untersuchten und keine Abweichung der Allelfrequenz dieser Gruppe vom Kontrollkollektiv fanden.

Augenblicklich werden unterschiedliche Einflußgrößen diskutiert, die den individuellen Zellverlust bei der HIV-Krankheit bestimmen können. Auf Seiten des Wirtes kommen Chemokin-Rezeptor-Polymorphismen (Δ32-CCR5), eine wirkungsvolle CD8-zellvermittelte, zytotoxische Immunantwort, aber auch eine nichtzytolytisch-suppressive Immunantwort in Frage. Weiterhin haben Langzeitüberlebende eine höhere Zahl von zytotoxischen und neutralisierenden Antikörpern (anti-HIV Antikörpern). Ein intaktes Immunsystem mit geringer Viruslast und histologisch intakte Lymphknoten ohne Virusnachweis sowie weniger virulente Virusstämme sind gehäuft bei LTNP zu finden *(Buchbinder et al. 1999)*. Bei Patienten mit beschleunigter Krankheitsprogression wurden im Gegensatz zu Langzeitüberlebenden gehäuft Virusstämme mit gesteigerter Virulenz gefunden. Die Infektion mit HIV durch einen Menschen im AIDS-Stadium vermindert möglicherweise die Inkubationszeit, wodurch es zu einem beschleunigten Verlauf der Krankheit beim Empfänger kommt *(van Griensven et al. 1990, Polk et al. 1987)*.

6.4 Wasting Syndrom

In frühen Stadien der HIV-Erkrankung sind die CD4-Zellzahl und die Viruslast die zuverlässigsten Parameter, um Aussagen über die Krankheitsprogression der HIV-Infektion zu treffen. Mit Fortschreiten der Krankheit treten die immunologischen Parameter zunehmend in den Hintergrund, während klinische Symptome der Immundefizienz an Bedeutung gewinnen. Gunter et al. (1993) und Suttmann et al. (1995) zeigten, daß im fortgeschrittenen AIDS-Stadium das Wasting Syndrom einen aussagekräftigeren Parameter hinsichtlich der Krankheitsprogression darstellt als die CD4-Zellen. Man vermutet, daß die beim Wasting Syndrom zu beobachtende

Hypertriglyzeridämie durch Zytokine, insbesondere TNF-α, Interleukine und Interferone, verursacht wird *(Feingold et al. 1989, Blackham et al. 1992).*

Die im klinischen Alltag gebräuchliche Definition des Wasting Syndroms ist der Verlust von mehr als 10% des Körpergewichts in 12 Monaten und entweder chronische Diarrhoe oder Abgeschlagenheit und / oder Fieber (länger als 30 Tage) ohne andere erklärbare Erkrankung. In der Literatur wird von einer Prävalenz dieses Syndroms von ca. 18,4% ausgegangen *(Hoover et al. 1993)* wohingegen das von uns untersuchte Kollektiv eine Prävalenz von 8,4% zeigte. Als Ursache für die unterschiedliche Prävalenz kommen systematische Fehler in Frage, wie zum Beispiel die Fallzahl und die Auswahl der Kollektive (CDC-Stadien, Alter, Begleiterkrankungen, etc.). Desweiteren spielt der Zeitpunkt, an dem die Daten erhoben wurde, eine bedeutende Rolle in der Analyse der Prävalenz, da neuere Therapieformen einen günstigen Einfluß auf AIDS-begleitende Symptome wie das Wasting Syndrom ausüben und somit in Studien neueren Datums geringere Fallzahlen zu finden sind *(Brodt et al. 1997)*.

In unserer Studie fand sich keine Korrelation zwischen bestimmten TNF-α Polymorphismen und dem Auftreten des Wasting Syndroms. Bisher sind in der Literatur keine Studien zu finden, die diesen Zusammenhang untersucht haben.

Bei der Annahme bleibend, daß TNF-α für die Entstehung des Wasting Syndromes (mit-)verantwortlich ist, kommen neben unmittelbaren Veränderungen im Gen bzw. im Promotor des TNF-α sämtliche regulierenden Elemente in Frage, die Einfluß auf die Expression und Sekretion des TNF-α haben. Gleichermaßen kommen Veränderungen anderer Zytokine in Betracht, die nicht Gegenstand dieser Untersuchungen waren. Weiterhin sind systematische Fehler möglich, da seltene Allele oder andere genetische Variationen bei einer Fallzahl von 251 Patienten unter Umständen nicht zu signifikanten Ergebnissen führen.

6.5 HIV-Enzephalopathie

Vergleichbar dem Wasting Syndrom ist das Auftreten der HIV-Enzephalopathie mit einer massiven Immunsuppression assoziiert und als eine Manifestation des

Endstadiums AIDS zu betrachten. Sie ist eine der häufigsten ZNS-Komplikationen im Rahmen der fortgeschrittenen HIV-Erkrankung.

Die HIV-Enzephalopathie ist Folge der Infektion neuronaler Glia und der durch virale Proteine bedingten Zytokindysregulation. Diese Zellen werden durch das virale tat-Protein zur Synthese von TNF-α angeregt, wodurch die Entzündung des ZNS unterhalten wird *(Chen et al. 1997)*. Die Entzündungsaktivität wird durch die TNF-α vermittelte Aktivierung des NF-κB aufrechterhalten. Die mRNA-Konzentration des TNF-α im Liquor cerebrospinalis korreliert mit der Ausprägung der neurologischen Symptome *(Mayne et al. 1998)*. Des weiteren stellt die TNF-α-Konzentration im Liquor einen guten Parameter für das Ausmaß der ZNS-Beteiligung bei HIV-Patienten dar *(Mastroianni et al. 1992)*.

Eine HIV-Enzephalopathie wurde bei denjenigen Patienten diagnostiziert, die kognitive oder motorische Störungen aufwiesen, wodurch sie im Beruf oder bei Aktivitäten des täglichen Lebens beeinträchtigt waren und die ohne erkennbare Ursache über Wochen hinweg zunahmen. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, daß die Prävalenz der HIV-Enzephalopathie deutlich von dem Krankheitsstadium abhängig ist. Diese Relation wird in vielen Untersuchungen nicht beachtet, was durch die starke Varianz der Ergebnisse deutlich wird. In unserem Kollektiv handelte es sich um die Prävalenz des Gesamtkollektivs, die bei 8,4% lag. Martinez et al. (1995) berichten von einer Prävalenz von 8,0%. In einer anderen Studie lag die Prävalenz zwischen 7,3% bei Patienten, die weniger als 100 CD4-Zellen/µl haben und 0,5% in einem Kollektiv mit über 500 CD4-Zellen/µl *(Bacellar et al. 1994)*.

Es wurde in der vorliegenden Studie keine Assoziation zwischen dem TNF-α-Genotyp und der HIV-Enzephalopathie gefunden. Sato-Matsumura und Mitarbeiter (1998) untersuchten 44 HIV-Patienten mit autopsiegesicherter HIV-Enzephalopathie und 30 Patienten ohne Enzephalopathie und fanden ebenfalls keine Assoziation. Zu den systematischen Fehlern dieser Studie muß die Größe des Kollektivs in Betracht gezogen werden, da das Auftreten seltener Allele oder anderer Variationen bei einer Fallzahl von 251 Patienten unter Umständen keine signifikanten Ergebnisse liefert.

Khanna et al. (2000) konnten zeigen, daß beim Vorliegen verschiedener HIV-1-Varianten die Auswirkung auf die Sekretion des TNF-α sehr variabel sein kann. Auch auf Seiten des Wirts können veränderte Chemokinrezeptoren, z.B. die heterozygote Δ32-CCR5-Alteration, zu atypischen Verläufen bei zentralnervöser Infektion führen. Auf der Ebene neuronaler Transmitter kann eine Dysregulation im Bereich des Dopaminsystems zum Auftreten der HIV-Enzephalopathie führen *(Lopez et al. 1999)*. Auf zellulärer Ebene ist eine durch neuronale Makrophagen vermittelte Degeneration der Glia als mögliche Ursache der HIV-Enzephalopathie denkbar.

6.6 Methodische Aspekte

Für die Untersuchung von PCR-Fragmenten stellt die SSCP-Analyse ein schnelles und kostengünstiges Suchverfahren auf unbekannte genetische Alterationen dar, da bereits ein einziger Basenaustausch zu einem veränderten Migrationsverhalten in der Elektrophorese führen kann *(Orita et al. 1989)*. Die SSCP eignet sich zur Untersuchung von Punktmutationen mit der höchsten Sensitivität im Fragmentlängenbereich von 100 bis 300 Basenpaaren *(Larsen et al. 1999)*. Neben der Fragmentlänge und deren Basenfolge wird die Sensitivität der SSCP von unterschiedlichen Faktoren wie der Temperatur, der Pufferzusammensetzung und der Gelkomposition beeinflußt *(Hayashi et al. 1993, Kukita et al. 1997)*.
Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erzielen, wurde aus diesen Gründen in der vorliegenden Studie eine Fragmentlänge für die untersuchten PCR-Produkte von 119 bis 301 Basenpaaren gewählt und sämtliche PCR-Produkte unter vier verschiedenen Bedingungen in der Gelelektrophorese aufgetrennt.

In keinem der Fragmente mit Ausnahme des Promotorfragmentes 2 (-440 bis -199 bp relativ vom Transkriptionsstart) zeigte sich in der SSCP-Analyse eine Mobilitätsänderung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, da bislang keine Polymorphismen außerhalb der Promotorregion im TNF-α-Gen gefunden wurden *(Herrmann et al. 1998)*. Das Promotorfragment 2 enthielt die bereits beschriebenen Polymorphismen bei -376, -308 (AP2), -244 (AP3) und -238 (AP4). Allerdings ist kritisch anzumerken, daß aufgrund der begrenzten Sensitivität der SSCP eine oder mehrere Sequenzalterationen in den analysierten Abschnitten in unserem Kollektiv möglicherweise nicht detektiert worden sind. Die

Angaben zur Sensitivität der SSCP variieren in der Literatur stark und reichen von 47% bis 84% *(Larsen et al. 1999)* über 94% *(Gross et al. 1999)* bis zu 97% *(Sheffield et al. 1993)*.

Ausblick

Es hat sich gezeigt, daß das untersuchte Kollektiv in Relation zu den gefundenen Allelfrequenzen eine zu geringe Fallzahl hatte. Es wäre von höchstem Interesse, die gleiche Fragestellung an einem Kollektiv zu untersuchen, bei dem der HIV-Infektionszeitpunkt bekannt ist (prospektive Serokonverterstudie) und die Zahl der Studienteilnehmer groß genug ist, um auch sichere Aussagen über seltene Allelkombinationen treffen zu können.

Fast ausnahmelos wurden Studien zur Ermittlung der Bedeutung genetischer Faktoren auf die HIV-Krankheit mit Kaukasiern in entwickelten Ländern durchgeführt, obwohl die überwiegende Zahl der an HIV leidenden Menschen außerhalb dieses geographischen Raumes leben und ethnisch anderer Abstammung sind. Aus diesen Gründen ist über die genetische Suszeptibilität in Entwicklungsländern und bei anderen Rassen bisher fast nichts bekannt.

Die HIV-Krankheit macht am Beispiel von Zwillingsstudien deutlich, wie komplex die Ätiologie dieser Infektionskrankheit ist, da es offenbar ein erhöhtes Infektionsrisiko unter Verwandten gibt, deren Risiko mit der Nähe der Verwandtschaft wächst. Das resultierende Krankheitsbild wird von unterschiedlichen Genen beeinflußt, die von nichtgenetischen Faktoren abhängig oder unabhängig ihren Einfluß ausüben.

Die Assoziation zwischen AIDS und bestimmten HLA-Haplotypen sowie Mutationen in Chemokin-Rezeptor-Genen unterstützen die Bedeutung genetischer Determinanten des Wirts für den Verlauf der HIV-Infektion. So konnten Samson und Mitarbeiter (1996) zeigen, daß homozyote Träger des Δ32-CCR5-Polymorphismus einen eindeutigen Resistenzvorteil gegenüber HIV besitzen.

Zusammenfassung

Ungeachtet des weltweiten Bestrebens, die diversen Einflußgrößen auf die Progression der HIV-Krankheit zu determinieren, konnten bis heute nur wenige Faktoren identifiziert werden. Wir gingen der Frage nach, inwieweit genetische Variationen im Gen für den Tumor Nekrose Faktor-alpha einen Einfluß auf die Krankheitsprogression oder die Entstehung bzw. Ausprägung HIV-assoziierter Erkrankungen haben.

Die Promotorregion sowie die kodierenden Sequenzen des TNF-α-Gens wurden mittels SSCP-Analyse auf genetische Variationen untersucht. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der häufigsten bekannten Promotorpolymorphismen mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP). Die Bestätigung der Polymorphismen der RFLP-Analyse erfolgte an ausgewählten Proben durch DNA-Fluoreszenzsequenzierung. In sämtlichen Fällen handelte es sich um singuläre Basentransitionen von Guanin zu Adenin.

Unter Einbeziehung verschiedener Progressionsparameter wie der CD4-Zellzahl, des Zeitraumes vom ARC-Stadium zum AIDS-Stadium und AIDS-assoziierter Krankheiten wie dem Wasting Syndrom und der HIV-Enzephalopathie, erfolgte anschließend die statistische Analyse in Korrelation mit den ermittelten Genotypen.

Es zeigte sich bei keiner der statistischen Analysen eine signifikante Assoziation mit einem bestimmten TNF-α-Genotyp. Kritisch ist anzumerken, daß für einige Subanalysen die Größe der untersuchten Patientengruppe zu gering war, um eine statistische Aussagekraft für seltene Allele zu erreichen. Anhand der hier vorgelegten Ergebnisse hat der TNF-α-Genotyp weder einen Einfluß auf die Progression der HIV-Erkrankung noch auf die Ausbildung HIV-assoziierter Erkrankungen wie dem Wasting Syndrom oder der HIV-Enzephalopathie.

Anhang: CDC-Klassifikation

Die CDC-Klassifikation von 1993 teilt die HIV-Erkrankung in drei klinische Kategorien (A bis C) und in drei CD4-Zellzahlbereiche (1 bis 3) ein. In dieser 3 x 3 - Matrix werden die Patienten den Untergruppen A1 bis C3 zugeordnet.

In den drei klinischen Kategorien werden Symptomkomplexe oder Erkrankungen erfaßt, die während der HIV-Infektion auftreten können. Die Kategorie A entspricht dem asymptomatischen Stadium der Infektion. Kategorie B beinhaltet klinisch symptomatische Patienten ohne AIDS, wohingegen Kategorie C Patienten mit AIDS erfaßt. Neuklassifizierungen sind nur in einer Richtung möglich (Progression von A in Richtung C und von 1 nach 3), wohingegen Rückstufungen nicht gestattet sind.

	Klinische Kategorie		
CD4-Zellen/µl	A	B	C
1: > 500	A1	B1	C1
2: 200 - 499	A2	B2	C2
3: < 200	A3	B3	C3

Tab.24: Die CDC-Klassifikation
Subgruppen-Matrix A1 bis C3: A (asymptomatisch), B (Symptome, kein AIDS), C (Symptome, AIDS)

Kategorie A	Kategorie C
• Asymptomatische HIV-Infektion • Persistierende generalisierte Lymphadenopathie (LAS) **Kategorie B** Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in die AIDS-definierende Kategorie C fallen, dennoch aber der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen. Hierzu zählen: • Bazilläre Angiomatose • Oropharyngeale Candida-Infektionen • Vulvovaginale Candida-Infektionen, die entweder chronisch (länger als einen Monat) oder nur schlecht therapierbar sind • Zervikale Dysplasien oder Carcinoma in situ • Konstitutionelle Symptome wie Fieber über 38.5°C oder eine länger als 4 Wochen bestehende Diarrhoe • Orale Haarleukoplakie • Herpes zoster bei Befall mehrerer Dermatome oder nach Rezidiven in einem Dermatom • Idiopathische thrombozytopenische Purpura • Listeriose • Entzündungen des kleinen Beckens, besonders bei Komplikationen eines Tuben- oder Ovarialabszesses • Periphere Neuropathie	AIDS-definierende Erkrankungen: • Pneumocystis carinii-Pneumonie • Toxoplasma-Enzephalitis • Ösophageale Candida-Infektion oder Befall von Bronchien, Trachea oder Lungen • Chronische Herpes simplex Ulzera oder Herpesbronchitis, -pneumonie oder -ösophagitis • CMV-Retinitis • Generalisierte CMV-Infektion (nicht von Leber oder Milz) • Rezidivierende Salmonellenseptikämien • Rezidivierende Pneumonien innerhalb eines Jahres • Extrapulmonale Kryptokokkeninfektionen • Chronische intestinale Kryptosporidieninfektion • Chronische intestinale Infektion mit Isospora belli • Disseminierte oder extrapulmonale Histoplasmose oder Tuberkulose • Infektionen mit Mykobakterium avium complex oder M.kansasii, disseminiert oder extrapulmonal • Kaposi-Sarkom • Maligne Lymphome (Burkitt's Lymphom, immunoblastisches oder primäres zerebrales Lymphom) • Invasives Zervix-Karzinom • HIV-Enzephalopathie • Progressive multifokale Leukenzephalopathie • Wasting Syndrom

Tab.25: Klinische Kategorien der CDC-Klassifikation

Literaturverzeichnis

Agresti, A. (1992) "A survey of exact inference for contegency tables." Statistical Science. 7:131-153

Alcami, J., Lain de Terra, T., Folgueira, L. et al. (1995) "Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes." EMBO J. 14:1552-1560

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C. et al. (1996) "CC-CXR5: A RANTES, MIP-1alpha, MPI-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science. 272:1955-1958

Bacellar, H., Munoz, A., Miller, E.N. et al. (1994) "Temporal trends in the incidence of HIV-1-related neurologic disease: Multicenter AIDS Cohort Study, 1985-1992." Neurology. 44:1892

Blackham, M., Cesar, D., Park, O.J. et al. (1992) "Effects of recombinant monokines on hepatic pyruvat dehydrogenase (PDH), PDH kinase, de novo lipogenesis and plasma triglycerides. Abolition by prior fasting." Biochem J. 284:129-135

Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A. et al. (1997) "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T- lymphocytes." Proc Natl Acad Sci. 94:1925-1930

Brinkmann, B.M., Keet, I.P., Miedema, F. et al. (1997) "Polymorphisms within the human tumor necrosis factor-α promotor region in human immunideficiency virus type 1 seropositive persons." J Inf Dis.175:188-190

Brockhaus, M., Schoenfeld, H.J., Schlaeger, E.J. et al. (1990) "Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci USA. 87:3127-3131

Brodt, H.R., Kamps, B.S., Gute, P. et al. (1997) "Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy." AIDS. 11:1731-1738

Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessol, N.A. et al. (1994) "Long-term HIV-1 infection without immunologic progression." AIDS. 8:1123-1128

Buchbinder, S., Vittinghoff, E. (1999) "HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications." Microbes Infect. 1:1113-1120

Cabrera, M., Shaw, M.A., Sharpless, C. et al. (1995) "Polymorphism in the tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis." J Exp Med. 182:1259-1264

Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P. et al. (1999) "HLA and HIV: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage." Science. 283:1748-1752

Centers for Disease Control: "1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults." MMWR. 41:1-19

Chen, P., Mayne, M., Power, C. et al. (1997) "The Tat-Protein of HIV-1 induces tumor necrosis factor-alpha production. Implications for HIV-1 associated neurological disease." J Biol Chem. 272:22385-22388

Chen J.J., Cloyd M.W. (1999) "The potential importance of HIV-induction of lymphocyte homing to lymph nodes." Int Immunol. 1:1591-1594

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y. et al. (1996) "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 faciliate infection by primary HIV-1 isolates." Cell. 85:1135-1148

Ciaffoni, S., Luzzati, R., Roata et al. (1992) "Presence and significance of cold agglutinins in patients with HIV infection." Haematologica. 77:233-236

Cocchi, F. et al. (1995) "Identification of RANTES, MIP-1a and MIP-1b as the major HIV-suppressing factors produced by CD8+ cells." Science. 270:1811-1815

Conway, D.J. Holland, M.J. Bailey, R.L. et al. (1997) "Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promotor and with elevated TNF-alpha levels in tear fluid." Infect Immun. 65:1003-1006

D'Alfonso, S., Richardi, P.M. (1994) "A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promotor region." Immunogenetics. 39:150-154

Deng, H.K., Liu, R., Ellmeier, W. et al. (1996) "Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1." Nature. 381:661-666

Deng, H.K., Unutmaz, D., Kewalramani, V.N. et al. (1997) "Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses." Nature. 388:296-300

De Waal, M.R., Abrams, J., Bennett, C.G. et al. (1991) "Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produces by monocytes." J Exp Med. 174:1209-1220

Dezube, B.J., Lederman, M.M., Spritzler, J.G. et al. (1995). "High-dose Pentoxiphylline in patients with AIDS: Inhibition of tumor necrosis factor production." J Inf Dis. 171:1628-1632

Doranz, B.J., Rucker J., Yi, Y., Smyth, R.J. et al. (1996) "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell. 85:1149-1148

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P. et al. (1996) "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature. 381:667-673

Edinger, A.L., Clements, J.E., Doms, R.W. (1999) "Chemokine and orphan receptors in HIV-2 and SIV tropism and pathogenesis." Virology. 260:211-221

Endress, S., Fuelle, H.J., Sinha, B. et al. (1991) "Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor-alpha and Interleukin-1b by human mononuclear cells." Immunology. 72:56-60

Farzan, M., Choe, H., Martin, K. et al. (1997) "Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection." J Exp Med. 186:405-411

Fauci, A.S. (1996) "Host factor and the pathogenesis of HIV-induced disease." Nature. 384:529-534

Fazely, F., Dezube, B.J., Allen-Ryan, J. et al. (1991) "Pentoxiphylline (Trental) decreases the replication of the human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood mononuclear cells and in cultured T-cells." Blood. 8:1653-1656

Feingold, K.R., Soued, M., Serio, M.K. et al. (1989) "Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo." Endocrinology. 125:267-274

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. et al. (1996) "HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein coupled receptor." Science. 272:872-877

Fouchier, R. A., Schuitemaker, H. et al. (1996) "Molecular determinants of human immunodeficiency virus type 1 phenotype variability." Eur J Clin Invest. 26:175-185

Garry, R.F. (1989) "Potential mechanisms for the cytopathic properties of HIV." AIDS. 3:683-694

van Griensven, G.J., de Vroome, E.M., de Wolf, F. et al. (1990) "Risk factors for progression of human immunodeficiency virus (HIV) infection among seroconverted and seropositive homosexual men." Am J Epidemiol. 132:203-210

Gross, E., Arnold, N., Goette, J. et al. (1999) "A comparison of BRCA1 mutation analysis by directing sequencing, SSCP and DHPLC." Hum Genet. 105:72-78

Hamann, A., Mantzoros, C., Vidal-Puig, A. et al. (1995) "Genetic variability in the TNF-α promotor is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM)." Biochem Biophys Res Commun. 211:833-839

Hayashi, K., Yandell, D.W. (1993) "How sensitive ist PCR-SSCP?" Hum Mutat. 2:338-346

Haynes, B.F., Pantaleo, G., Fauci, A.S. (1996) "Towards an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection." Science. 271:324-328

Hellerstein, M.K., Kahn, J., Mudie, H. et al. (1990) "Current approach to the treatment of human immunodeficiency virus associated weight loss: Pathophysiologic considerations and emerging management strategies." Semin Oncol. 17:17-33

Hellerstein, M.K., Grunfeld, C., Wu, K.J. et al (1993) "Increased de novo hepatic lipogenesis in human immunodeficiency virus infection." Clin Endocrinol Metab. 76:559-565

Hellerstein, M.K., Wu, K., McGrath, M. et al. (1996) "Effects of dietary n-3 fatty acid supplementation in men with weight loss associated with the acquired immune deficiency syndrome: Relation to indices of cytokine production." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 11:258-270

Herrmann, S.M., Ricard, S., Nicaud, V. (1998) "Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity." Europ J Clin Invest. 28:59-66

Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D. (1991) "Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria." Nature. 352:595-600

Hoover, D.R., Saah, A.J., Bacellar, H. et al. (1993) "Clinical manifestations of AIDS in the era of pneumocystis prophylaxis. Multicenter AIDS Cohort Study." N Engl J Med. 329:1922-1926

Kaufmann, G.R., Cunningham, P., Zaunders, J. et al. (1999) "Impact of early HIV-1 RNA and T-lymphocyte dynamics during primary HIV-1 infection on the subsequent course of HIV-1 RNA levels and CD4+ T-lymphocyte counts in the first year of HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr. 22:437-444

Keet, I.P.M., Krol, A., Klein, M.R. et al. (1994) "Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4 cell counts." J Infect Dis. 169:1236-1243

Kindler, V., Sappino, A.P., Grau, G.E. et al. (1989) "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granuloma during BCG infection." Cell. 56:731-740

Khanna, K.V., Yu, X.F., Ford, D.H. et al. (2000) "Differences among HIV-1 variants in their ability to elicit secretion of TNF-alpha." J Immunol. 164:1408-1415

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S. et al. (1984) "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV". Nature. 312:767-768

Klein, S.A., Dobmeyer, J.M., Dobmeyer, T.S. et al. (1996) " TNF-alpha mediated apoptosis of CD4 positive T-lymphocytes. A model of T-cell depletion in HIV infected individuals." Eur J Med Res. 1:249-258

Knight, J.C., Udalova, I., Hill, A.V.S. et al. (1999) "A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria." Nature Genet. 22:145-150

Knuchel, M.C., Spira, T.J., Neumann, A.U. et al. (1998) "Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter and HIV type 1 disease progression." AIDS Res Hum Retroviruses.14:305-309

Kotler, D.P., Wang, J., Pierson, R.N. (1985) "Body composition studies in patients with the acquired immunodeficiency syndrome." Am J Clin Nutr. 42:1255-1265

Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J. (1997) "The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription." Mol Immunol. 34:391-399

Kukita, Y., Tahira, T., Sommer, S.S. Hayahi, K. (1997) "SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel." Hum Mutat. 10:400-407

Kwiatkowski, D., Hill, A.V., Sambou, I. et al. (1990) "TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria." Lancet. 336:1201-1204

Larsen, L.A., Christiansen, M., Vuust, J. et al. (1999) "High-throughput single-base conformation polymorphism analysis by autosomal capillary electrophoresis: Robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants." Hum Mut. 13:318-327

Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H. et al. (1987) "Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor." Cell. 50:975-985

Liao, F., Alkhatib, G., Peden, K.W. C. et al. (1997) "STRL-33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1." J Exp Med. 185:2015-2023

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S. et al. (1996) "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell. 86:367-377

Liu, S.L., Schacker, T., Musey, I. et al. (1997) "Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: Human immunodeficiency type 1 evolution and antiretroviral response." J Virol. 71:4284-4295

Luoie, L.G., Newman, B., King, M.C. (1991) "Influence of host genotype on progression to AIDS among HIV infected men". J Acquir Immune Defic Syndr. 4:814-818

Lopez, O.L., Smith, G., Meltzer, C.C. et al. (1999) "Dopamine systems in human immunodeficiency virus-associated dementia." Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol. 12:184-192

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S. et al. (1986) "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." Cell. 47:333-348

Martinez, A.J., Sell, M., Mitrovics, T. et al. (1995) "The neuropathology and epidemiology of AIDS. A Berlin experience. A review of 200 cases." Pathol Res Pract. 191:427-443

Mastroianni, C.M., Paoletti, F., Valenti, C. (1992) "Tumour necrosis factor (TNF-alpha) and neurological disorders in HIV infection." J Neurol Neurosurg Psychiatry. 55:219-221

Mayne, M., Bratanich, A.C., Chen, P. (1998) "HIV-1 tat molecular diversity and induction of TNF-alpha: Implications for HIV-induced neurological disease." Neuroimmunomodulation. 5:184-192

McGuire, W., Hill, A.V., Allsopp, C.E. et al. (1994) "Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria." Nature. 371:508-510

Moffatt, M.F., Cookson, W.O. et al. (1997) "Tumour necrosis factor haplotypes and asthma." Hum Molec Genet. 6:551-554

Moreira, A.L., Sampaio, E.P., Zmuidzinas, A. et al. (1993) "Thalidomid exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor-alpha by enhancing mRNA degradation." J Exp Med. 177:1675-1680

Nadel, S., Newport, M.J., Booy, R. et al. (1996) "Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease." J Infect Dis. 174:878-880

Nath, A., Conant, K., Chen, P. et al. (1999) "Transient exposure to HIV-1 tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon." J Biol Chem. 274:17098-17102

Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y. et al. (1985) "Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, homology and chromosomal localization." Nucleic Acids Res. 13:6361-6373

Nuovo, G.J., Alfieri, M.L. (1996) "AIDS dementia complex is associated with massive, activated HIV-1 infection and concommitant expression of several cytokines." Mol Gen. 2: 358-366

Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F. et al. (1996) "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T cellline-adapted HIV-1." Nature. 382:833-835

Orenstein, J., Fox, C., Wahl, S. (1997) "Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections." Science. 276:1857-1861

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H. et al. (1989) "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms." Proc Natl Acad Sci U S A. 86:2766-2770

Osborne, L., Kunkel, S., Nabel, G.J. (1989) "Tumor necrosis factor-alpha and Interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the Nuclear Factor kB." Proc Natl Acad Sci USA. 86:2336

Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F. et al. (1993) "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." Nature. 362:355-358

Pantaleo, G., Fauci, A.S. (1995) "New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection." Annu Rev Immunol. 13:487-512

Papavassiliou, A.G. et al. (1995) "Transscription factors." N Engl J Med. 332:45-47

Paxton, W.A., Martin, S:, Tse, D. et al. (1996) "Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multi high-risk sexual exposures." Nat Med. 2:412-417

Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S. (1984) "Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." Nature. 312:724-729

Petrucci, A., Dorrucci, M., Alliegro, M.B. et al. (1997) "How many HIV-1 infected individuals may be defined as long-term non-progressors? A report from the Italian Seroconversion Study." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 14:243-248

Philip, R., Ebstein, L.B. (1986) "Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and Interleukin-1." Nature. 320:86-88

Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K. et al. (1995) "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." Int Immunol. 7:517-523

Price, R. (1995) "Management of AIDS dementia complex and HIV infection of the nervous system." AIDS. 9:211

Polk, B.F., Fox, R., Brookmeyer, R. et al. (1987) "Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men." N Engl J Med. 316:61-66

Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C. et al. (1995) "Mechanism of endotoxin-desensitization: Involvement of Interleukin-10 and transforming growth factor β." J Exp Med. 18:1887-1892

Raymond, S., Weintraub, L. (1959) "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis". Science. 130: 711

Reyes-Teran, G., Sierra-Madero, J.G., Martinez del Cerro, V. et al. (1996) "Effects of thalidomide on HIV associated wasting syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." AIDS. 10:1501-1507

Riesner, D., Steger, G., Zimmat, R. et al. (1989) "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations and protein-nucleic acid interactions." Electrophoresis. 10:377-389

Roper, W. L., Peterson, H. B., Curran, J. W. (1993) "Commentary: Condoms and HIV/ STD prevention - clarifying the message." Am J Public Health. 83:501-503

Roy, S., McGuire, W., Mascie-Taylor, C.G. et al. (1997) "Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy." J Infect Dis. 176:530-532

Royall, J.A., Berkow, R.L., Beckman, J.S. et al. (1989) "Tumor necrosis factor and Interleukin-1 increase vascular endothelial permeability." Am J Physiol. 257:399-410

Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C. et al. (1996) "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochem. 35: 3362-3367

Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J. et al. (1996) "Resistance to HIV infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature. 382:722-725

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A. 74:5463-5467

Sato-Matsumura, K.C., Berger, J., Hainfellner, J.A. (1998) "Development of HIV encephalitis in AIDS and TNF-alpha regulatory elements." J Neuroimmunol. 91:89-92

Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E. et al. (1993) "The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions." Genomics. 16:325-332

Sippy, B.D., Hofman, F.M., Wallach, D. et al. (1995) "Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 10:511-512

Smith, M.W., Dean.M., Carrington, M. et al (1997) "Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Mulitycenter AIDS Cohort Study (MACS), Multiycenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study." Science. 277:959-965

Spira, A.I., Marx, P.A., Patterson, B.K. et al.(1996) "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques." J Exp Med. 183:215-225

Stauber, G.B., Aiyer, R.A., Aggarwal, B.B. (1988) "Human tumor necrosis factor alpha receptor. Purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization." J Biol Chem. 263:19098-19104

Steel, C.M., Ludlam, C.A., Beatson, D. et al. (1988) "HLA haplotype A1 B8 DR3 as a risk factor for HIV related disease." Lancet. 1:1185-1188

Steward, G.J., Ashton, L.J., Biti, R.A. et al. (1997) "Increased frequency of heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-infection." AIDS. 11:1833-1838

Strawford, A., Hellerstein, M. (1998) "The etiology of wasting in the human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome." Semin Oncol 25:76-81

Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E. et al. (1985) "Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro." Science. 230:943-945

Suttmann, U., Selberg, O., Gallati, H. et al. (1994) "Tumor necrosis factor receptors levels are linked to the acute phase response and malnutrition in human immunodeficiency virus infected patients". Clin Sci. 86:461-467

Suttmann, U., Ockenga, J., Selberg, O. et al. (1995) "Incidence and prognostic value of malnutrition and wasting in human immunodeficiency virus infected outpatients." J AIDS. 8:239-246

Szeffler, S.J., Norton, C.E., Ball, B. et al. (1989) "IFN-gamma and LPS overcome glucocorticoid inhibition of priming for superoxide release in human monocytes. Evidence that secretion of IL-1 and tumor necrosis factor-alpha is not essential for monocyte priming." J Immunol. 142:3984-3992

Tartaglia, L.A. , Ayres, T.M., Wong, G.H.W. et al. (1993) "A novel domain within the 55 kD TNF receptor signals cell death." Cell. 74:845

Verduyn, W., Doxiadis, I.I.N., Anholts, J. et al. (1993) "Biotinylated DRB sequence-specific oligonucleotides. Comparison to serological HLA-DR typing of organ donors in Eurotransplant." Hum Immunol. 35:59-66

Wilson, A.G., di Giovine, F.S., Blakemore, A.I., Duff, G.W. (1992) "Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor-alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product." Hum Mol Genet.1:353

Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L. (1997) "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-alpha promotor on transcriptional activation." Proc Natl Acad Sci U S A 94:3195-3199

Zabel, P., Wolter, D.T., Schoenharting, M.M. et al. (1989) "Oxpentiphylline in endotoxaemia." Lancet. 334:1474-1477

Zimmermann, P.A., Buckler-White, A., Alkhatib, G. et al (1997) "Inherited resistance to HIV conferred by an inactivation mutation in CC chemokine receptor 5: Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk." Molec Med. 3:23-26

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Köttgen, der die finanziellen Mittel bereitstellte und wesentlich zur Durchführung der Arbeit beitrug.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Anleitung von Herrn Dr. Heiko Witt angefertigt.
Ihm gilt mein spezieller Dank, da er durch seine hervorragende Betreuung und seine unermüdbare Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt ferner Frau Carola Graf und Frau Petra Felsch, die bei allen Fragen der täglichen Praxis stets zur Seite standen.

Herrn Dr. Frank Bergmann möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit in der Tagesklinik des Rudolf-Virchow-Klinikums danken. Ebenso danke ich dem Pflegepersonal der Tagesklinik, die freundlicherweise die Organisation der Blutproben übernahmen.

Mein besonderer Dank sei auch Herrn André Schröter und Frau Claudia Karowski sowie Herrn Tomas Caspers ausgesprochen, die mir mit vielen wertvollen Anregungen bei der Gestaltung zur Seite standen.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir materiell wie ideell meine Universitätsausbildung und diese Arbeit erst ermöglichten.

Lebenslauf

10.03.1971:	geboren in Nürnberg als erste Tochter des Ehepaares Hedda und Hans Jürgen Schüttlöffel
1977-1981:	Besuch der Grundschule in Wintersdorf bei Zirndorf
1981-1982:	Besuch des Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasiums in Oberasbach
1982-1985:	Besuch der Deutschen Schule in London, England
1985-1990:	Besuch des Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasiums in Oberasbach
Juni 1990:	Erlangung der Hochschulreife
Oktober 1990 bis September 1993:	Überbrückung der Wartezeit zum Medizinstudium mit pflegerischen Tätigkeiten an der Universitätsklinik Erlangen und im Zentralklinikum Augsburg
WS 1993/94:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Leipzig
WS 1994/95:	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
März 1995:	Absolvierung des Physikums, danach Wechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin
März 1996:	Absolvierung des ersten medizinischen Staatsexamens in Berlin
April 1996:	Beginn der Dissertation im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité (Humboldt-Universität zu Berlin)
April 1998:	Immatrikulation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
März 2000:	Absolvierung des zweiten medizinischen Staatsexamens in Bonn
Mai 2001	Absolvierung des dritten medizinischen Staatsexamens in Bonn