

### **Abschlussbericht Teilprojekt 11.3.3**

- Projekttitlel:** Charakterisierung der Immunfunktion bei Hepatitis C Virus-positiven Patienten mit Hepatozellulären Karzinomen und B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen
- Projektleiter:** Prof. Dr. med. U .Spenger, Prof. Dr. med. T. Sauerbruch  
Universitätsklinikum der Universität Bonn  
Medizinische Klinik und Poliklinik I  
Allgemeine Innere Medizin  
Sigmund-Freud-Str. 25  
53105 Bonn
- Telefon:** +49(0) 228-287 6789
- Fax:** +49(0) 228-287 4323
- E-Mail:** spengler@uni-bonn.de
- Berichtszeitraum:** 01.02.2002 – 31.01.2005

Im Rahmen dieses Projektes sollten Patienten mit HCV-assoziierten Kryoglobulinämien, B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) und hepatozellulären Karzinomen (HCC) identifiziert und untersucht werden. Von diesen Patienten sollten zunächst DNA-, Plasma- und Serumproben sowie mononukleäre Zellen (PBMC) gewonnen werden. Als Kontrollgruppen dienten hierbei Patienten mit unkomplizierter HCV-Infektion sowie gesunde Personen.

Neben der Erhebung laborchemischer und klinischer Daten wurden relevante virologische Parameter dokumentiert, so z. B. Dauer der HCV-Infektion, Infektionsmodus, Viruslast und HCV-Genotyp. Alle Patienten wurden bezüglich ihrer MHC Klasse I- und II-Allele sowie weiterer für die Immunantwort relevanter Zytokin-Polymorphismen genotypisiert, im einzelnen waren dies CCR5-delta32, IL-6 -174 C/G, TNF-alpha -308 A/G, TGF-beta 10 T/C, 25 C/G, IL-10 -1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C, IFN-gamma -174 C/G, +874 T/A. Hier fanden sich bislang keine Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen.

Weiterhin wurden Stimulationsexperimente an PBMC durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Induzierbarkeit von an der Immunantwort auf chronische Virusinfektionen beteiligten Chemokinen und Zytokinen zwischen den untersuchten Patientengruppen zu entdecken. Hierzu wurden PBMC mit aufgereinigten rekombinanten HCV-Proteinen (core, E2, NS3) inkubiert und die Zytokin- bzw. Chemokinantwort auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time RT-PCR gemessen. Im einzelnen wurde so die Expression von CCL3 (MIP-1alpha), CCL4 (MIP-1beta), CCL5 (Rantes), CCL19 (MIP-3beta), CCL20 (MIP-3alpha), CXCL9 (MIG), CXCL11 (I-TAC), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Interferon-gamma (IFN-gamma) bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass von den untersuchten Proteinen lediglich HCV core Überexpression von IL-6 und IL-8 induziert.

Die Induktion von IL-6 und IL-8 durch HCV core Protein wurde daher im folgenden auch auf Proteinebene mittels ELISA nachgewiesen. Ebenfalls mittels ELISA wurden die Serumkonzentrationen von IL-6 und IL-8 bei den oben genannten Patientengruppen gemessen. Hier fanden wir signifikant höhere Serumkonzentrationen von IL-6 bei allen HCV-positiven Patientengruppen im

Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die IL-6 Serumkonzentrationen waren ausserdem in der Gruppe der HCV-assoziierten Kryoglobulinämien und HCC gegenüber der Gruppe mit unkomplizierter HCV-Infektion erhöht. Für IL-8 fanden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Mittels FACS-Analyse konnte nach intrazellulärer Zytokinfärbung gezeigt werden, dass Interleukin-6 nach Stimulation von PBMC oder von Vollblut mit HCV core durch CD14-positive Monozyten gebildet wird.

Da insbesondere das Auftreten von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) als Folge einer chronisch-replikativen Hepatitis C-Virusinfektion ein sehr seltenes Ereignis darstellt, können in der Regel nicht ausreichend grosse Fallzahlen an einem einzelnen Zentrum rekrutiert werden, um Fragen zu immunologischen Auffälligkeiten bei dieser Patientengruppe zu untersuchen. Aus diesem Grund stellt hier die Kooperation vieler grosser Schwerpunktzentren im Rahmen des Kompetenznetzes Hepatitis eine einzigartige Möglichkeit dar, auch derart komplexe Fragestellungen anzugehen.

Trotz der Seltenheit der Erkrankung in Mitteleuropa hat sich hier die Netzwerkstruktur weitgehend bewährt. So konnte durch Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Essen, der Abteilung für Innere Medizin der Ruhr-Universität Bochum im Knappschaftskrankenhaus, der Abteilung für Onkologie der Universität zu Köln, der Abteilung für Innere Medizin, Gastroenterologie und Hepatologie an der Charité in Berlin, der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Homburg/Saar und weiterer Zentren Probenmaterial von bislang 14 Patienten mit HCV-assoziierten B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen, 17 Patienten mit HCV-assoziiierter Kryoglobulinämie und 54 Patienten mit HCV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinom (HCC) asserviert und untersucht werden.

Insbesondere die Zusammenarbeit mit den Universitäten Bochum und Essen waren in diesem Zusammenhang besonders erfolgreich, da beide Zentren an der genannten Patientenpopulation ebenfalls aufgrund eines anderen, im Rahmen des Kompetenznetzes Maligne Lymphome geförderten Projektes zur Prävalenz von HCV-Infektionen bei neudiagnostizierten B-NHL, interessiert sind.

Die bislang erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HCV core-vermittelte Induktion von IL-6 und IL-8 eine Rolle bei der Entstehung der untersuchten HCV-assoziierten Malignome spielen könnte, wobei das Auftreten von Kryoglobulinämien bei lang andauernder replikativer HCV-Infektion als Vorstufe zur Entstehung von B-NHL angesehen wird. Beide Zytokine sind seit längerem als potente B-Zell-Wachstumsfaktoren bekannt, auch über eine mögliche Beteiligung von IL-6 bei der Entstehung von HCC wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren spekuliert.

Wir planen, als nächsten Schritt den Mechanismus zu untersuchen, über den extrazellulär zugegebenes HCV-core Protein die Heraufregulation von IL-6 und IL-8 in CD14-positiven Zellen induziert. Hierzu sollen zunächst Blockierungsexperimente mit TLR-Antikörpern durchgeführt werden, darüber hinaus ist die systematische Aufklärung der an der HCV core- induzierten Zytokinsynthese beteiligten second messenger-Antwort vorgesehen.

Desweiteren sollen Untersuchungen zur biologischen Relevanz der dargestellten Befunde angestellt werden. Hierzu soll zunächst untersucht werden, ob die Proliferationsraten von aus HCV-positiven oder HCV-naiven Patienten isolierten B-Zellen durch Ko-Inkubation mit HCV core Protein beeinflusst werden. Da zuvor gezeigt wurde, dass die Zytokinantwort nach Stimulation mit core Protein durch CD14-positive Monozyten erfolgt, gehen wir davon aus, hier keinen direkten Effekt zu beobachten.

Als nächstes sollen von den beschriebenen Patientengruppen isolierte B-Zellen mit Zellkulturüberständen von PBMC der jeweils gleichen Patientengruppen inkubiert werden, um zu untersuchen, ob die von CD14-positiven Zellen sezernierten Zytokine tatsächlich die Proliferationsraten von B-Zellen beeinflussen.

Weiterhin möchten wir analog untersuchen, ob die so gewonnenen Zellkulturüberstände einen Einfluss auf die z. B. durch Zugabe von Fas-Ligand zu B-Zellen induzierten Apoptoseraten zeigen.

Wir erhoffen uns von der Fortführung der hier dargestellten Arbeiten ein besseres

Verständnis der Ätiologie und Pathogenese von HCV-assoziierten Kryoglobulinämien, B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen und hepatozellulären Karzinomen. Die erzielten Ergebnisse könnten auch eine Bedeutung für das Verständnis anderer mit Infektionen assoziierter Malignome haben, etwa der MALT-Lymphome bei *Helicobacter pylori*-Besiedlung.

Darüberhinaus beinhalten die Untersuchungen zur pathogenetischen Bedeutung von IL-6 bei der Entstehung HCV-assoziiierter B-Zell-proliferativer Erkrankungen zumindest prinzipiell auch das Potenzial zur Entwicklung neuer Therapie- und Prophylaxestrategien, etwa durch mögliche Untersuchungen zum Einsatz von IL-6 Rezeptorantagonisten zur Primärprophylaxe dieser Erkrankungen.

Teile der im Rahmen dieses Projektes bislang gewonnenen Daten wurden auf der Jahrestagung der DGVS 2004 als Poster präsentiert, ausserdem wurden abstracts für die Jahrestagungen der EASL und GASL 2005 zur Posterpräsentation eingereicht.

Wir planen darüberhinaus eine Veröffentlichung der zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten als Originalarbeit.