

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische  
Immunologie, Rheumatologie)

**Einfluss von Ribavirin und Amantadin  
auf immunkompetente Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Lohs, Susanne Maria geborene Walcker**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 09.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1 HEPATITIS C.....	7
1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis-C-Virus .....	7
1.1.2 Virologie und molekularbiologische Aspekte.....	7
1.1.3 Infektionsweg, Epidemiologie und Prophylaxe.....	8
1.1.4 Diagnostik der HCV-Infektion .....	10
1.1.5 Histopathologie der Hepatitis-C-Infektion.....	10
1.1.6 Klinischer Verlauf.....	11
1.1.7 Therapie der Hepatitis C .....	12
1.2 IMMUNOLOGIE .....	12
1.2.1 Immunreaktionen bei Virusinfektionen .....	12
1.2.2 Allgemeine antivirale T-Zell-Antwort.....	14
1.2.3 TH <sub>1</sub> /TH <sub>2</sub> -Balance .....	16
1.2.4 Immunpathogenese der Hepatitis C.....	19
1.2.5 Spezielle immunologische Testverfahren .....	21
1.3 RIBAVIRIN.....	28
1.3.1 Geschichtlicher Überblick .....	28
1.3.2 Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität.....	28
1.3.3 Klinische Anwendung.....	33
1.3.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung .....	33
1.4 AMANTADIN .....	34
1.4.1 Geschichtlicher Überblick .....	34
1.4.2 Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität.....	34
1.4.3 Klinische Anwendung.....	36
1.4.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung .....	37
1.6 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....	37
<b>2. PROBANDEN, MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
2.1 PROBANDEN .....	39
2.2 MATERIAL, REAGENZIEN, MEDIEN UND GERÄTE .....	39
2.2.1 Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut .....	39
2.2.2 Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT).....	39
2.2.3 Reagenzien für die FACS-Analyse .....	40
2.2.4 Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-ELISA.....	40
2.2.5 Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA.....	41
2.2.6 Antikörper für den Zytokin-ELISA.....	41
2.2.7 Antigene.....	41
2.2.8 Medikamente.....	42
2.2.9 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	42
2.3 METHODEN .....	43
2.3.1 Serumgewinnung.....	43
2.3.2 PBMC-Isolierung .....	43
2.3.3 Zellzahlbestimmung.....	44
2.3.4 Medikamentenkonzentrationen .....	45

2.3.5 Zellkulturen zur Bestimmung der Antigen-induzierten Lymphozyten-Proliferation ..	45
2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT).....	46
2.3.7 Zellkulturen für die Durchflusszytometrie und den enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA).....	47
2.3.8 Durchflusszytometrie.....	47
2.3.9 Zytokin-ELISA .....	48
2.4 STATISTIK .....	50
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
3.1 PROLIFERATIONSASSAY .....	50
3.1.1 Kinetik der Zellproliferation .....	50
3.1.2 Reaktion der PBMC auf Ribavirin ohne Kostimulation .....	52
3.1.3 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit BCG.....	53
3.1.4 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol .....	53
3.1.5 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit PPD.....	54
3.1.6 Reaktion der PBMC auf Amantadin ohne Kostimulation.....	55
3.1.7 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit BCG.....	56
3.1.8 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol .....	57
3.1.9 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit PPD .....	58
3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse des Proliferationsassays.....	59
3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	60
3.2.1 Reaktion der PBMC auf Ribavirin ohne Kostimulation .....	60
3.2.2 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit BCG.....	63
3.2.3 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol .....	66
3.2.4 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit PPD.....	69
3.2.5 Reaktion der PBMC auf Amantadin ohne Kostimulation.....	71
3.2.6 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit BCG.....	74
3.2.7 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol .....	76
3.2.8 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit PPD .....	79
3.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	81
3.3 ZY TOKIN-ELISA.....	83
3.3.1 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion Makrophagentypischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch PBMC.....	83
3.3.2 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion TH <sub>1</sub> -typischer Zytokine (TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) durch PBMC .....	90
3.3.3 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion TH <sub>2</sub> -typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC .....	95
3.3.4 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion regulatorischer T-Zellen-typischer Zytokine (IL-10) durch PBMC.....	100
3.3.5 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion allgemeiner T-Zellmarker (GM-CSF) durch PBMC .....	103
3.3.6 Einfluss von Amantadin auf die Produktion Makrophagen-typischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch PBMC.....	105
3.3.7 Einfluss von Amantadin auf die Produktion TH <sub>1</sub> -typischer Zytokine (TNF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ) durch PBMC .....	113
3.3.8 Einfluss von Amantadin auf die Produktion TH <sub>2</sub> -typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC .....	118
3.3.9 Einfluss von Amantadin auf die Produktion regulatorischer T-Zellen-typischer Zytokine (IL-10) durch PBMC .....	123

3.3.10 Einfluss von Amantadin auf die Produktion allgemeiner T-Zellmarker (GM-CSF) durch PBMC .....	126
3.3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse des Zytokin-ELISAs.....	128
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>132</b>
4.1 DISKUSSION DER METHODEN .....	132
4.1.1 Proliferationsassay .....	132
4.1.2 Durchflusszytometrie.....	134
4.1.3 Zytokin-ELISA .....	134
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	135
4.2.1 Proliferationsassay .....	135
4.2.2 Durchflusszytometrie.....	136
4.2.3 Zytokin-ELISA .....	138
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>143</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>145</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>150</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>151</b>
<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT .....</b>	<b>165</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>166</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
ConA	Concanavalin
cpm	counts per minute
DC	dendritische Zellen
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
etc.	et cetera
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
GBq	Gigabecquerel
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen - koloniestimulierender Faktor (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humane Leukozytenantigen
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LTT	Lymphozytentransformationstest
LTX	Lebertransplantation
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubimillimeter
mmol	millimol
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMDA	N-Methy-D-Aspartat
nmol	nanomol
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol

PEG-IFN- $\alpha$	pegyliertes Interferon-Alpha
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PPD	Purified Protein Derivative of Tuberculin
PWM	Pokeweed Mitogen
RNA	Ribonukleinsäure (ribic nucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s. o.	siehe oben
SI	Stimulationsindex
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sidescatter)
SVR	sustained virologic response
Tab.	Tabelle
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanus-Toxoid-Absorbat-Impfstof
v.a.	vor allem
w/o	ohne
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
$\mu$ g	Mikrogramm



# 1. Einleitung

## 1.1 Hepatitis C

### 1.1.1 Molekularbiologie des Hepatitis-C-Virus

Mithilfe molekularbiologischer Methoden konnte 1989 das Hepatitis-C-Virus (HCV) als Erreger der sogenannten Non-A-/ Non-B-Hepatitis (NANBH) identifiziert<sup>1</sup> und erste serologische Tests für das HCV entwickelt werden<sup>2</sup>. Zudem gelang die Charakterisierung des größten Teils des viralen Genoms<sup>3</sup>. Nachdem serologische Tests zum Nachweis des HCV eingeführt wurden, erkannte man, dass die meisten transfusionsassoziierten Hepatitiden durch eine HCV-Infektion ausgelöst worden waren. Heute können nahezu alle HCV-infizierten Personen erkannt und von der Blutspende ausgeschlossen werden. Das Restrisiko einer unerkannt infektiösen Spende im diagnostischen Fenster wird anhand mathematischer Modelle aktuell auf circa 1:3 Millionen geschätzt<sup>4</sup>.

### 1.1.2 Virologie und molekularbiologische Aspekte

Das Hepatitis-C-Virus ist eine Hepavirus, welches der Familie der Flaviviridae zugeordnet wird. Es handelt sich hierbei um ein lineares, behülltes Einzelstrang-RNA-Virus, welches eine Plusstrang Polarität aufweist und aus 9.500 Nukleotiden besteht. Das Virus hat einen Durchmesser von 40 bis 60 nm. Die lipidhaltige Hülle mit den zwei Oberflächenproteinen E1 und E2 umschließt das sphärische Nukleokapsid.

Aufgrund seiner hohen Mutationsrate verfügt das HCV über eine große genetische Variabilität, was seine Viruspersistenz und Resistenz gegen antivirale Substanzen bewirken kann.

Das HCV hat sich evolutionsbedingt in verschiedene Hauptgruppen und deren Subtypen entwickelt. Inzwischen sind sieben Genotypen (1, 2, 3 ...) und 68 Subtypen (1a, 1b, 1c ...) bekannt<sup>5</sup>.

Diese Geno- und Subtypen sind unterschiedlich geographisch verteilt. Am weitesten verbreitet sind die HCV-Typen 1a und 1b, welche in Europa und Amerika überwiegen. In Deutschland ist der Subtyp 1b, gefolgt von Subtyp 1a, vorherrschend<sup>6</sup>. Umstritten ist die Beobachtung, dass die Schwere des Krankheitsverlaufes mit dem HCV-Genotyp korreliert<sup>7</sup>. Es wurde mehrfach berichtet, dass eine Infektion mit Genotyp 1 und besonders mit Subtyp 1b eine stärkere Leberschädigung und ein häufigeres Auftreten einer Zirrhose zur Folge hat<sup>8,9,10</sup>.

Einzelne Studien haben gezeigt, dass der Genotyp 1 weniger gut auf eine antivirale Therapie mit Interferon anspricht als die Genotypen 2 und 3<sup>11,12</sup>.

### **1.1.3 Infektionsweg, Epidemiologie und Prophylaxe**

Der Mensch ist der einzige bekannte natürliche Wirt des HCV. Das Virus kann parenteral, sexuell oder vertikal übertragen werden. HCV kann je nach Viruskonzentration im Blut auch in weiteren Körperflüssigkeiten wie Tränen, Speichel, Schweiß und Sperma nachgewiesen werden. Eine sexuelle Übertragbarkeit des HCV konnte bislang nicht ausgeschlossen werden. Es scheint aber, dass ein Übertragungsrisiko im Gegensatz zur Hepatitis B eher gering ist<sup>13</sup>. Das Risiko einer vertikalen Virusübertragung von der Mutter auf das Kind beträgt drei bis fünf Prozent und hängt von der Viruskonzentration im mütterlichen Blut ab. Ein weiterer Infektionsweg sind Nadelstichverletzungen mit kontaminierten Kanülen. Hier beträgt das Transmissionsrisiko ca. zwei bis drei Prozent.

Weltweit sind etwa 71 Millionen Menschen mit dem HC-Virus infiziert und gefährdet, eine Leberzirrhose und/ oder ein Leberkarzinom zu entwickeln<sup>14</sup>. Laut der WHO kommt es weltweit jährlich zu 1,75 Millionen Neuinfektionen mit HCV. Pro Jahr wird weltweit mit 399.999 Todesfällen infolge von HCV-Infektionen oder HCV-bedingten Lebererkrankungen gerechnet<sup>14</sup>.

Die HCV-Antikörper-Prävalenz schwankt in den verschiedenen Ländern. So liegt diese beispielsweise in Ägypten bei ca. zu 20 % hoch. In Deutschland beträgt die Seroprävalenz für Anti-HCV-Antikörper ca. 0,3 % der Bevölkerung. Hiervon sind 84 % HCV-PCR positiv getestet<sup>15</sup>.

Im späten 20. Jahrhundert breitete sich HCV v.a. parenteral über unsterile Injektionsutensilien (in nichtindustrialisierten Ländern) und den i.v.-Drogenkonsum (in industrialisierten Ländern) aus. Schätzungen zufolge kam es im Jahr 2000 weltweit zu 2,0 Millionen Neuinfektionen mit HCV durch verunreinigte Kanülen. Seit dem Jahr 2005 ist die Inzidenz von HCV-Erstdiagnosen sinkend.

Die Antikörperprävalenzen variieren in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. So weisen Personen mit mehrjährigem i.v.-Drogengebrauch Antikörperprävalenzen bis zu 90 % auf.

Zum Schutz vor berufsbedingter Infektion müssen in Deutschland Mitarbeiter in medizinischen Berufen regelmäßig auf ihren HCV-Status getestet werden<sup>16</sup>. Im Falle eines HCV-RNA-Nachweises, darf der Mitarbeiter bestimmte Tätigkeiten nicht mehr ausführen.

Das Infektionsschutzgesetz schreibt seit 2001 vor, dass alle Fälle von HCV-Neuinfektionen an das Robert Koch-Institut gemeldet werden müssen.

Weltweit werden 27 % aller Fälle von Leberzirrhose und 25 % der Fälle von hepatozellulärem Karzinom auf eine chronische HCV-Infektion zurückgeführt<sup>17</sup>.

Leider ist bis heute keine effektive prophylaktische aktive oder passive Impfung gegen die Hepatitis C-Virusinfektion entwickelt worden, da es sich beim HCV um ein RNA-Virus mit hoher Mutationsrate handelt, was die Entwicklung eines Aktivimpfstoffes sehr schwierig gestaltet.

In einer Studie an Schimpansen führte ein Impfstoff, basierend auf dem viralen Hüllprotein, zu einer Ausschüttung von HCV-spezifischen Antikörpern<sup>18</sup>. Weiterhin erfolgte eine Testung eines Impfstoffes, welcher auf den viralen Nichtstrukturproteinen basiert, bei gesunden Probanden. Hier wurde eine ausgeprägte HCV-spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst. In der anschließenden Testung dieses Vakzins bei Drogenabhängigen zeigte sich jedoch kein erhöhter Schutz vor einer chronischen Hepatitis C-Infektion<sup>19,20</sup>.

#### **1.1.4 Diagnostik der HCV-Infektion**

In der Regel liegt die Inkubations- bzw. Serokonversionszeit bei sechs bis neun Wochen. Teilweise beträgt sie aber auch zwei bis 24 Wochen.

Bei Verdacht auf eine Hepatitis C wird zunächst ein Immunoassay angefertigt, in dem spezifische Antikörper gegen HCV nachgewiesen werden können. Bei positiver Testung, folgt die Testung auf Virus-RNA (z.B. mittels PCR). Fällt der PCR-Befund bei positivem Antikörperbefund negativ aus, wird die Testung nach drei bis sechs Monaten wiederholt. Die Erkrankung gilt als ausgeheilt, sollte die HCV-PCR erneut negativ ausfallen. Die HCV-PCR erlaubt darüber hinaus einen frühzeitigen Erregernachweis ein bis vier Wochen nach Exposition und dient zudem der Genotypen Differenzierung. Zur Planung einer Therapie, sollte die Viruslast sowie der Genotyp bestimmt werden und ein klinisches Staging erfolgen. Zudem sollte eine Koinfektion mit HBV/HDV oder HIV sowie HAV bei Neudiagnose einer HCV-Infektion ausgeschlossen werden. Eine Biopsie der Leber ist nur erforderlich, sollten sich hieraus therapeutische Konsequenzen ergeben.

#### **1.1.5 Histopathologie der Hepatitis-C-Infektion**

Eine akute HCV-Infektion bewirkt eine Leberzellschädigung mit Einzelzellnekrosen und verstärkter Leberzellregeneration. Man findet ballonierte Hepatozyten und Councilman-Körper. Es kommt zu einer Proliferation der Kupffer-Zellproliferation, die sich zu Kupfferzellknötchen zusammenlagern.

Im ungünstigen Falle einer fulminanten Hepatitis C Verlaufsform kommt es rasch zu panazinären Nekrosen, welche zu einem Zusammenfall des Lebergerüsts führen, wohingegen die entzündliche Komponente eher gering ausgeprägt ist.

Bei der chronisch-persistierenden Hepatitis finden sich morphologisch neben dem milden lymphozytären Infiltrat zusätzlich Milchglaszellen. Das entzündliche Infiltrat enthält reichlich Plasmazellen. Die Hepatozyten können als Zeichen einer Schädigung eosinophile Zytoplasmakondensierungen aufweisen.

Bei der chronisch-aggressiven Hepatitis C bilden sich sogenannte Mottenfraßnekrosen - in schweren Fällen Brückennekrosen - zwischen portalen Feldern und Zentralvenen. Im weiteren Lauf kommt es zu einem zirrhotischen Umbau mit Verlust der Läppchenarchitektur.

Bei mehr als der Hälfte der Patienten mit einer akuten oder chronischen Hepatitis C kann man portale Ansammlungen von Lymphozyten, welche Keimzentren bilden können vorfinden. Ferner können die Gallengangsepithelien geschädigt sein und die Leberepithelien grobtropfig verfetten<sup>21</sup>.

### **1.1.6 Klinischer Verlauf**

Bei circa 75 % der Erkrankten verläuft die Infektion asymptomatisch oder geht mit nur unspezifischen z. B. grippeähnlichen Symptomen einher. In 25 % der Fälle entwickelt sich eine akute, (meist) milde Hepatitis mit oftmals nur leicht erhöhten Transaminasewerten und begleitendem Ikterus. Selten treten fulminante Verläufe auf.

Die Angaben zur Chronifizierung schwanken erheblich, lagen in neueren Untersuchungen aber bei 50 bis 85 %<sup>22,23,24</sup>. Die chronische HCV-Infektion verläuft klinisch oft charakteristisch und mild. Abgeschlagenheit, Leistungsabfall, unspezifische Oberbauchbeschwerden, Gewichtsverlust, z. T. auch Pruritus und Gelenkbeschwerden können auftreten und typischerweise mit fluktuierenden Transaminasenerhöhungen einhergehen. Mit einer Latenz von 20 bis 30 Jahren entwickelt sich bei rund 20 % der chronisch mit HCV infizierten Menschen eine Leberzirrhose.

Neben der Krankheitsdauer gilt ein täglicher Alkoholkonsum als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose. Hierbei gilt ein Konsum von über 20 mg pro Tag als besonders gefährdend<sup>25</sup>. Ein weiterer Risikofaktor ist der Infektionsweg. Der posttranstransfusionelle Übertragungsweg ist prognostisch bedeutend schlechter als der durch i.v.-Drogenkonsum. Zudem beeinflussen der Immunstatus und eine mögliche Koinfektion mit Hepatitis B oder HIV den weiteren Verlauf der Erkrankung<sup>26</sup>.

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 bis 5 % pro Jahr entwickeln Patienten mit HCV-induzierter Zirrhose ein Leberzellkarzinom.

Selten kommt es zu einer spontanen Viruselimination und Ausheilung der chronischen Hepatitis.

Als ansteckend gelten Personen, bei denen das Virus im Blut vorhanden ist. Eine Ansteckung kann schon mehrere Wochen vor Auftreten der ersten Symptome beginnen.

### **1.1.7 Therapie der Hepatitis C**

Selten heilt eine akute Hepatitis C spontan aus. Im Gegensatz zur chronischen Hepatitis C kann eine akute Hepatitis C besser mit einer antiviralen Therapie geheilt werden, weswegen diese möglichst innerhalb der ersten drei bis vier Monate eingeleitet werden sollte, um so die Mortalität zu senken<sup>27</sup>.

Die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C bei Therapie-naiven Patienten war vor Einführung der neuen Substanzen lange Zeit die Behandlung mit pegyliertem Interferon-Alpha (PEG-IFN- $\alpha$ ) in Kombination mit Ribavirin über 24 oder 48 Wochen (abhängig vom HCV-Genotyp). Die Heilungsrate lag bei Infektion mit dem in Deutschland am häufigsten vorkommenden Genotyp 1 bei 40 bis 50 %<sup>28</sup>.

Durch die Zulassung direkt antiviral wirksamer Medikamente (Proteasehemmer, Polymerasehemmer und NS5A-Hemmer) existiert inzwischen eine nebenwirkungsarme, hocheffektive Therapie für fast alle Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion mit Heilungsraten zwischen 80 bis über 90 %<sup>29</sup>.

## **1.2 Immunologie**

### **1.2.1 Immunreaktionen bei Virusinfektionen**

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Virusabwehr unspezifische (angeborene) und spezifische (adaptive) Komponenten des Immunsystems.

Diese lassen sich jeweils in einen zellulären und einen humoralen Anteil gliedern. Der zelluläre Anteil besteht aus einzelnen Abwehrzellen (Leukozyten). Das Wort humoral bezieht sich auf die Körperflüssigkeiten. Es handelt sich beim humoralen Anteil also um Abwehrstoffe, die in Flüssigkeiten wie dem

Plasma oder der Lympheflüssigkeit gelöst sind. Das HLA-System ist für den Übergang von der unspezifischen zur spezifischen Immunabwehr verantwortlich.

Während die unspezifischen Reaktionen sofort beim viralen Eindringen zur Verfügung stehen, benötigen spezifische Reaktionen bis zu ihrer voll ausgebildeten Effektorphase im Durchschnitt etwa zwölf Tage.

Zur unspezifischen Abwehr gehören unter anderem die Interferone, die sehr schnell bereits am Eintrittsort des Virus rekrutiert werden. Die Interferone-alpha und -beta (IFN- $\alpha$  und - $\beta$ ) wirken insbesondere virostatisch und proliferationshemmend, wohingegen Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ein wichtiges Zytokin der immunologischen Signalübertragung und der Effektorphase von T-Lymphozyten ist. Beim Menschen wird IFN- $\alpha$  vorwiegend von Bluteukozyten und lymphoblastoiden Zellen gebildet, IFN- $\beta$  vor allem von Fibroblasten und IFN- $\gamma$  von immunkompetenten T-Zellen.

Bei der Replikation von Viren wird die Transkription der Interferongene selbst oder durch virusveränderte zelluläre Transkriptionsfaktoren induziert. Die Interferone selbst hemmen nicht die Virusvermehrung. Einmal freigesetzt induzieren sie in benachbarten, noch nicht infizierten Zellen den antiviralen Status, indem sie an definierte Rezeptoren der Zellmembran gebunden werden. In den IFN-stimulierten Zellen wird die Repression von Genen zur Synthese von Effektor-Proteinen aufgehoben, die den antiviralen Status und andere Veränderungen der Zelle bewirken. IFN wirkt im Allgemeinen nicht virusspezifisch: durch ein bestimmtes Virus induziertes IFN schützt auch gegenüber anderen Viren.

Interferone induzieren in exponierten Zellen die Synthese einer Reihe von antiviral wirkenden Substanzen, u. a. die beiden Enzymen Proteinkinase R (PKR) und 2'5'-Oligo-Adenylat-Synthetase (2'5' OAS). Die PKR blockiert durch Phosphorylierung von Initiationsfaktoren die Proteinsynthese, während das Produkt der Adenylat-Synthetase eine Ribonuklease stimuliert, die einzelsträngige RNA zerschneidet. Folglich ist ein vollständiger Replikationszyklus für das infizierende Virus nicht mehr möglich. Des Weiteren

regen Interferone die Bildung von Mx-Proteinen an. Diese GTPasen hemmen die Replikation verschiedener RNA-Viren.

Interferone werden derzeit allein oder kombiniert mit anderen Virostatika in der Therapie einiger persistierender Virusinfektionen eingesetzt.

Neben diesen humoralen unspezifischen Abwehrmaßnahmen haben die höheren Wirbeltiere auch ein zelluläres unspezifisches Abwehrsystem entwickelt. So sind die NK-Zellen in der Lage, Zellen zu zerstören und nach erfolgter Signalübertragung sofort bereit zu stehen. Ihre Aktivität wird durch IFN- $\alpha$  und - $\beta$  wesentlich gesteigert. Bei den Killerzellen führt die Abwesenheit oder eine verminderte Expressionsdichte von MHC-Klasse-I-Molekülen zu zytolytischer Aktivität. Immungenetische Studien belegen, dass den NK-Zellen bei der spontanen Ausheilung der HCV Infektion eine wesentliche Bedeutung zukommt<sup>30</sup>. Mit ihrer Zytokinsekretion wirken sie zudem anti-viral und beeinflussen das Immunsystem<sup>31</sup>.

Da sich alle Viren obligat intrazellulär replizieren, kommt der zellulären Abwehr bei viralen Infektionen eine höhere Bedeutung zu als bei bakteriellen Infektionen. Zur Kontrolle viraler Infektionen tragen vor allem zwei Effektormechanismen der spezifischen Immunität bei: Einerseits die Neutralisation extrazellulärer Viruspartikel durch Komplexierung mit virusspezifischen Antikörpern und die Eliminierung dieser Komplexe durch phagozytierende Zellen. Andererseits die spezifische Zerstörung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten.

### **1.2.2 Allgemeine antivirale T-Zell-Antwort**

T-Lymphozyten sind unter anderem verantwortlich für die zellvermittelte Immunität, wobei sie ihre Funktion über antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) an der Oberfläche ausüben. Dieser membranständige Antigenrezeptor erkennt nur zellgebundene Bruchstücke von Antigenen im Kontext mit körpereigenen MHC-Molekülen und bindet an den Antigen/MHC-Komplex.

„Cluster of Differentiation“ (CD) ist die Bezeichnung für spezielle Oberflächenausprägungen auf Leukozyten. Tabelle 1 führt die CD auf, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. In der Durchflusszytometrie



wurden Antikörper gegen spezielle CD-Moleküle, welche nur auf bestimmten Leukozyten ausgeprägt sind, eingesetzt um verschiedene Leukozyten zu differenzieren. Hierzu wurden die CD-Antikörper mit Molekülen markiert (FITC, PerCP, PE), welche zur Fluoreszenz angeregt werden können.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen tragen das CD4-Molekül und erkennen Peptide exogener Antigene auf MHC-Klasse II, die v.a. von Zellen mit guter Antigenaufnahme (wie dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten) angeboten werden<sup>32</sup>. Sie übernehmen als sogenannte T-Helferzellen regulatorische Funktionen in der Immunantwort: So bestimmen sie die Quantität und Qualität der von B-Zellen produzierten virusantigenspezifischen Immunglobuline, unterstützen die Entwicklung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, interagieren intensiv mit B-Lymphozyten und Makrophagen. Ihre Funktionen üben sie im Wesentlichen über Lymphokine aus. T-Helferzellen ohne bisherigen Antigenkontakt werden als TH<sub>0</sub>-Zellen bezeichnet. Die Immunantwort auf Tetanustoxin, mit dem man in der Regel nur kurzfristig in Kontakt kommt, ist ein typisches Beispiel für eine TH<sub>0</sub>-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort, die mit der Sekretion eines breiten Zytokinmusters (z. B. IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ, TNF-α, IL-10) einhergeht: Sowohl eine starke Antikörperantwort als auch eine Immunreaktion vom verzögerten Typ im Hauttest kann nachgewiesen werden.

Nach Antigen-Kontakt können sich antigenspezifische bzw. allergenspezifische T-Zell-Klone entwickeln. TH-Zellen können in zwei Subpopulationen unterteilt werden. TH<sub>1</sub>-Zell-Klone produzieren die Zytokine Interleukin-2 (IL-2), TNF-α/β sowie IFN-γ und induzieren die zellvermittelte Immunreaktion. TH<sub>2</sub>-Zellen schütten die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 aus. Beide T-Zell-Populationen produzieren IL-3 und GM-CSF. Insgesamt ist keine strikte Unterscheidung von Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> möglich und oft eher ein tendenzieller denn absoluter Unterschied der Zytokinproduktion zu messen.

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen tragen das CD8-Molekül und entwickeln sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten (T-Killerzellen). Diese können infizierte, körpereigene Zellen erkennen und zerstören. Sie erkennen das Peptid auf HLA-Klasse I, also Peptide zelleigenen oder viralen Ursprungs. Der Antikörper gegen CD69 dient als Aktivierungsmarker, da CD69 nur von aktivierten Zellen sezerniert wird.

CD-Antigen	Antigentragende Zellen	Funktion	Verwandschaft
CD4	TH1- und TH2-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Corezeptor für MHC-II Moleküle	Immunglobulin
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC-I Moleküle	Immunglobulin
CD19	B-Zellen	Komplexbildung mit CD21 und CD81; Corezeptor für B-Zellen	Immunglobulin
CD56	NK-Zellen	Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM); Adhäsionsmolekül	Immunglobulin
CD69	Aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	Frühes Aktivierungsantigen	C-Typ-Lektin

Tabelle 1: Cluster of Differentiation (Auswahl)

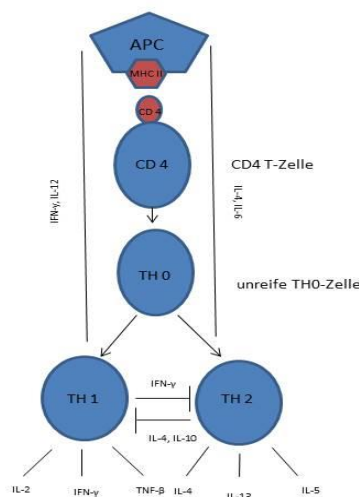
### 1.2.3 TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>-Balance

Während die Spezifität der T-Zellen im Thymus bestimmt wird, wird die Art der Immunantwort in den sekundären lymphoiden Organen durch den unmittelbaren Antigenkontakt und der das Antigen präsentierenden antigenpräsentierende Zelle (APZ) determiniert. Ob sich TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-Zellen differenzieren, ist von verschiedenen Faktoren abhängig (siehe Abbildung 1): Die Stimulation der APZ durch das Antigen selbst ist mitentscheidend für die weitere Art der Immunantwort. So ist eine TH<sub>2</sub>-Immunantwort typisch für die IgE-vermittelte Allergie, welche gegen harmlose Proteine gerichtet ist. Somit fällt die Entscheidung, wie das Immunsystem auf ein Antigen reagiert (TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-dominant), bereits recht früh im Rahmen der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems. Die einmal gewählte Richtung der Immunreaktion wird durch die eingeleitete Zytokinproduktion (siehe Tabelle 2) verstärkt, da TH<sub>2</sub>-Zytokine (z. B. IL-5, IL-13) die Entwicklung zu TH<sub>2</sub>-Zellen fördern und diejenigen zu TH<sub>1</sub> blockieren. Umgekehrt fördern TH<sub>1</sub>-typische Zytokine (TNF-β, IFN-γ) die Differenzierung zu TH<sub>1</sub>-Zellen<sup>33</sup>. Des Weiteren wird die Differenzierung zu TH<sub>1</sub> oder TH<sub>2</sub> durch die Art der APZ beeinflusst. So können TH<sub>2</sub>-, nicht aber TH<sub>1</sub>-Zellen, durch B-Lymphozyten als APZ stimuliert werden. Bei einer überwiegenden Ausschüttung von TH<sub>2</sub>-Zellen, werden vermehrt B-Zellen aktiviert, die die humorale Immunantwort durch Antikörperbildung stärken. Eine vermehrte TH<sub>1</sub>-Antwort bewirkt eine

Stimulierung der zellulären Immunantwort durch eine Makrophagenaktivierung und eine Stimulierung von B-Zellen zur Antikörperbildung<sup>34</sup>.

B-Zellen können zwar Proteinantigene aufnehmen und prozessieren, aber nicht bakterielle Antigene verdauen. Auch die Zytokinproduktion einer als APZ fungierenden B-Zelle ist unterschiedlich im Vergleich zu dendritischen Zellen oder Makrophagen<sup>35</sup>.

Da nicht alle immunologischen Antworten auf das klassische TH<sub>1</sub>-/ TH<sub>2</sub>-System zurückzuführen waren, wurde im Jahr 2005 ein weiterer Untertyp der TH-Zellen beschrieben, die TH<sub>17</sub>-Zellen. Diese sind wichtig bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze, was v.a. durch die Anreicherung von neutrophilen Granulozyten durch IL-17 geschieht.



**Abbildung 1: Zytokin-übermittelte Differenzierung zu TH1/ TH2-Zellen**  
(Quelle: Eigene Darstellung)

Zytokin	Wichtige Produzenten	Wichtige Zielzellen	Immunologische Effekte
<b>IL-1</b>	Monozyten/ Makrophagen, T- Zellen (TH <sub>1</sub> /TH <sub>2</sub> ), B-Zellen, dendritische Zellen (DC)	T- und B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Endothelzellen	Proinflammatorisches Zytokin, Bildung von Akute-Phase-Proteinen, T- B-, DC-, NK-Zell-Aktivierung
<b>IL-2</b>	T-Zellen	T-, B- und NK- Zellen, Monozyten, Granulozyten	T-Zellaktivierung, klonale Expansion Apoptoseinduktion, Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von NK-, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten
<b>IL-3</b>	Aktivierte T- Zellen, Mastzellen, Eosinophile	Hämatopoetisch e Stamm- und Progenitorzellen, Granulozyten, Monozyten, Mastzellen	Zusammenwirken mit IL-5 und GM-CSF für myeloische Zellproliferation und Differenzierung
<b>IL-4</b>	T-Zellen	B-, T- und NK- Zellen, Monozyten, Progenitorzellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, Verstärkung der Bildung von IgG1 und IgE, Regulation der Ausbildung von CD23 auf Zellen und Monozyten, Aktivierung einer TH <sub>2</sub> - Antwort, Wachstumsfaktor für Mastzellen.
<b>IL-5</b>	T-Zellen, Mastzellen	Eosinophile und Basophile (B- Zellen)	B-Zellreifung, IgA- Klassenwechsel, Eosinophilenaktivierung
<b>IL-6</b>	Monozyten/ Makrophagen T- Zellen (TH <sub>2</sub> )	B-Zellen, Hepatozyten	Proinflammatorisches Zytokin, Akutphasereaktion, Wachstumsfaktor für B-Zellen, Kostimulator für T-Zellen
<b>IL-10</b>	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen (TH <sub>2</sub> ), B-Zellen	T-, NK- und B- Zellen, Mastzellen und Monozyten	Immunhemmung, inhibiert die Bildung von Zytokinen der TH <sub>1</sub> -Antwort, bewirkt Proliferation der B-Zellen
<b>IL-12</b>	B-Zellen, Zellen und Granulozyten	Monozyten, Makrophagen, B- Zellen, Dendritische Zellen	Einleiten einer TH <sub>1</sub> -Immunantwort, proinflammatorisches Zytokin, Induktion der Bildung von IFN- $\gamma$ und anderen Zytokinen der NK- und T-Zellen, Verbindung zw. angeborener und adaptiver Immunität.
<b>IL-13</b>	T-Zellen (TH <sub>1</sub> /TH <sub>2</sub> )	B-Zellen	Ig-Isotypenswitch nach IgE, Inhibition der Zytokinproduktion von Monozyten/ Makrophagen, Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen
<b>IL-17</b>	T-Zellen	Neutrophile Granulozyten	Proinflammatorisches Zytokin, Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen, Stimulierung anderer

Zytokin	Wichtige Produzenten	Wichtige Zielzellen	Immunologische Effekte
			entzündungsfördernder Zytokine wie beispielsweise IL-6 und IL-8
<b>IL-23</b>	Dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen	Bindegewebs- und Epithelzellen, Monozyten	Proinflammatorisches Zytokin, verstärkt die Ausschüttung von Zytokinen der TH <sub>17</sub> -Antwort
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	T-Zellen (TH <sub>1</sub> ), NK-Zellen	B-Zellen, Monozyten/ Makrophagen, NK-Zellen	Makrophagenaktivierung, Stimuliert die MHC-Expression, Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen, Aktivierung von zytotoxischen CD8 <sup>+</sup> -Zellen
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Monozyten/ Makrophagen, T-Zellen (TH <sub>1</sub> ), NK-Zellen	Monozyten, Granulozyten, T-, NK-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, Verstärkung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen, Aktivierung von T- und NK-Zellen
<b>TNF- <math>\beta</math></b>	T-Zellen (TH <sub>1</sub> )	T-, NK-Zellen	Steigert die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen
<b>GM-CSF</b>	Monozyten/ Makrophagen, T-Zellen (TH <sub>1</sub> / TH <sub>2</sub> )	Monozyten, Makrophagen,	Stimulation der Granulozyten- und Makrophagenreifung, Differenzierungsfaktor für APC, proinflammatorisch

Tabelle 2: Übersicht über wichtige Zytokine des Immunsystems

### 1.2.4 Immunpathogenese der Hepatitis C

Die Bildung HCV-spezifischer Antikörper beginnt etwa ab der achten Woche nach Infektion durch Aktivierung der B-Zellen. Im weiteren Verlauf der HCV-Infektion werden Antikörper gegen alle Proteine des Virus – Strukturproteine (HCV-Core, Envelope 1 und 2) und Nichtstrukturproteine (NS3 bis 5) – gebildet. In der Regel werden Antikörper gegen das konservierte HCV-Core oder gegen NS3 zuerst gebildet und können bei solitärem Vorliegen ein Hinweis auf eine akute Hepatitis C sein. Weder das Vorliegen eines einzelnen neutralisierenden Antikörpers noch eine bestimmte Konstellation von HCV-spezifischen Antikörpern im Serum mit protektivem Effekt konnte bei der HCV-Infektion identifiziert werden. HCV-spezifische Antikörper bleiben auch nach spontaner oder therapieinduzierter Ausheilung meist dauerhaft im Serum des Patienten nachweisbar<sup>36</sup>. Gegen die Beteiligung von Antikörpern bei der Viruselimination sprechen verschiedene Studien über vermeintlich neutralisierende Antikörper

gegen das Hüllprotein E2<sup>37,38</sup> und Studien, bei denen ein Absinken der IgM-Antikörper-Titer gegen HCV-Core unter Viruselimination gezeigt wurde, nach erfolgreicher IFN- $\alpha$ -Therapie<sup>39</sup>. Bisher haben HCV-spezifische Antikörper lediglich eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik der HCV-Infektion.

Inzwischen ist es gelungen, Korrelate einer protektiven Immunantwort, die eine Chronifizierung der Infektion verhindern, zu identifizieren<sup>40,41</sup>. Dabei sind Intensität, Epitopspezifität und das Zytokinprofil der T-Zellantwort von Bedeutung<sup>42</sup>. In humanen und tierexperimentellen Studien wurde nachgewiesen, dass eine starke und andauernde spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort und auch T-Helferzellantwort in der Anfangsphase einer Infektion eine Viruselimination bewirken kann bzw. bei unzureichender Immunantwort es zu einer Viruspersistenz kommen kann<sup>43,44</sup>.

Es wurde jedoch gezeigt, dass eine starke zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen alleine nicht ausreichend ist, um eine Infektion zu beseitigen. Vielmehr ist eine auf viele verschiedene Epitope gerichtete starke CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort und eine früh einsetzende und zudem multispezifische Reaktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nötig, um eine Ausheilung bewirken zu können. Ein TH<sub>1</sub>-Profil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen scheint hierbei von Vorteil zu sein, da diese die Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fördern und zudem antivirale Zytokine sezernieren. Dagegen soll eine Aktivierung durch TH<sub>2</sub>-Zytokine eher mit der Entwicklung einer chronischen Hepatitis C Erkrankung assoziiert sein. Außerdem sollte die T-Zellantwort mit der Bildung von T-Gedächtniszellen langanhaltend und persistierend sein, um einen chronischen Verlauf der HCV-Infektion zu verhindern. Bei Schimpansen wurde gezeigt, dass für eine erneute Infektion mit dem Hepatitis C-Virus das Vorhandensein von Gedächtniszellen oftmals entscheidend ist, um eine erneute Infektion mit dem Virus abermals zu beseitigen<sup>45</sup>. HCV scheint durch eine Störung der Zellreifung und Veränderung der Funktion der CD8<sup>+</sup>-Zellen ihre Funktionalität zu schwächen<sup>46</sup>.

Auffallend ist, dass bei chronisch infizierten Personen die T-Zellen eine verminderte Aktivität aufweisen. So ist die IFN- $\gamma$ -Produktion, Proliferation und Zytotoxizität der T-Zellen bei einer persistierenden Infektion verringert<sup>47</sup>. Chronische HCV Patienten weisen erhöhte IL-10-Titer auf. Bei *in vitro*

Untersuchungen wurde herausgefunden, dass IL-10 bildende CD8+ T-Zellen sowohl die IFN- $\gamma$ -Bildung als auch die Proliferation HCV-spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen unterdrücken kann<sup>48</sup>. Zudem scheint die Breite der Epitopspezifität eingeschränkt zu sein, da oft nur ein einzelnes virales Epitop erkannt wird. Es wurde weiterhin herausgefunden, dass auch nach Beseitigung des Virus die volle Funktionsfähigkeit der Immunzellen nicht wieder hergestellt wird<sup>49</sup>. Des Weiteren weisen die HCV-spezifischen T-Zellen bei einer HCV-Infektion einen unreifen Phänotyp auf<sup>50</sup> und es tritt eine vermehrte Frequenz sogenannter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen bei chronisch Infizierten auf, welche die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion antigenspezifischer T-Zellen inhibieren können<sup>51</sup>. Zusätzlich scheint das HCV-core Protein die Differenzierung und Proliferation der T-Zellen zu beeinflussen, indem der Signalweg des Zytokins IL-2 teilweise blockiert wird<sup>52</sup>.

	CD4	CD8
Akute Hepatitis C → Ausheilung	++++	+++
Akute Hepatitis C → Chronisch	+	+
Langzeitausgeheilte Patienten	++	+
Chronische Patienten	-	-
Interferon-Responder	++	(+)
Interferon-Non-Responder	+	-

**Tabelle 3: Stärke der HCV-spezifischen Immunantwort**

nach Manns et al. 2006<sup>53</sup>

### 1.2.5 Spezielle immunologische Testverfahren

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) können in ihrem Wachstum durch spezifische Antigene (in dieser Arbeit BCG, TT, PPD) und Mitogene angeregt werden.

Bacillus-Calmette-Guérin-Vakzine (BCG) ist ein Impfstoff aus lebenden, attenuierten Bakterien der Art Mykobacterium bovis. Primär wird BCG zur Impfung gegen Tuberkulose verwendet. BCG stimuliert die

Makrophagenproliferation und wirkt somit als Paraimmunitätsinduktor und selektiv zytotoxisch auf Tumorzellen.

Tetanus-Toxoid (TT, Tetanol<sup>®</sup>) stimuliert vor allem TH<sub>2</sub>-Zellen und wird als Impfstoff gegen Wundstarrkrampf verwendet.

Purified Protein Derivative of Tuberculin (PPD) ist ein isoliertes und gereinigtes Protein aus der Kultur von Tuberkulose-Erregern. Es wird im Tuberkulin-Hauttest zur Diagnose von Tuberkulose verwendet. PPD stimuliert v.a. TH<sub>1</sub>-Zellen.

Pokeweed Mitogen (PWM) zählt zu der Gruppe polyklonaler Mitogene und wird aus der Kermesbeere (*Phytolacca americana*) gewonnen. Mitogene regen Zellteilungen bei B- und T-Zellen an und besitzen agglutinierende Aktivität auf Erythrozyten und Leukozyten. Während Antigene die B- und T-Zellen nur über spezifisch bindende Rezeptoren aktivieren können (echte Immunantwort), reagieren Mitogene durch Stimulation dieser Zelltypen (keine spezifische Immunantwort). Wegen dieser Fähigkeit werden sie als polyklonale Aktivatoren bezeichnet.

Es ist schwierig, das Wachstum normaler Lymphozyten nach einem spezifischen Antigen-Reiz zu untersuchen, da immer nur ein minimaler Anteil der Zellen zur Teilung angeregt wird. Deswegen werden Mitogene zugesetzt.

Mitogene scheinen im Prinzip dieselben Mechanismen einer Wachstumsreaktion zu aktivieren wie ein spezifisches Antigen. Lymphozyten existieren normalerweise als ruhende Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Nach Stimulation mit einem polyklonalen Mitogen treten sie sofort in die G<sub>1</sub>-Phase ein und durchlaufen den gesamten Zyklus.

Beispiele für Mitogene:

- Pokeweed-Mitogen: PWM: aus der Kermesbeere (*Phytolacca americana*): wirkt auf B- und T-Zellen



- Phytohämagglutinin: PHA: aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*): wirkt auf T-Zellen
- Concanavalin A: ConA: aus der Schwertbohne (*Canavalia gladiata*): wirkt auf T-Zellen
- Lipopolysaccharid: LPS: aus Zellwänden Gram-negativer Bakterien: wirkt auf B-Zellen

Lymphozyten binden die Mitogene über spezifische Bindemoleküle:

- PWM + N-Acetyl-Chitobiose
- PHA + N-Acetyl-Galactosamin (Bestandteil von Blutgruppen; Hämagglutination)
- ConA + Mannose, Glucose
- LPS + LPS-Bindeprotein

Beim **Lymphozytentransformationstest** (LTT) wird die antigeninduzierte Lymphozytenvermehrung im Vergleich zur spontanen Proliferation (Leerwert) ermittelt. Als Maß für die Teilungsaktivität (Proliferation) der Zellen dient die Neusyntheserate der DNA, die über den Einbau von radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA erfasst wird.

Das Ergebnis wird als SI-Wert (Stimulationsindex = Quotient aus Einbau im Testansatz zu Einbau in der Leerkontrolle) angegeben. SI-Werte größer als drei dürfen als sicher positiv interpretiert werden, Werte zwischen zwei und drei zeigen mit großer Wahrscheinlichkeit einen positiven LTT an<sup>54</sup>.

Man kann hier also eine Aussage über die Stimulationsbereitschaft bzw. über die Proliferation der Lymphozyten treffen. Ruhende Zellen bauen kein Thymidin ein.

Bei der **Durchflusszytometrie**, auch Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) genannt, werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, an denen Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wurden. Besitzt die Zelle das gesuchte Membranprotein, so bindet der Antikörper und leuchtet im Laserlicht. Man kann die Menge an Membranprotein bestimmen, da je nach Menge an der

Oberfläche der Zelle auch entsprechende Antikörper und damit entsprechende Mengen an Fluoreszenzfarbstoff binden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ gearbeitet. Abbildung 2 stellt schematisch seine Funktionsweise dar. Das FACSCalibur ist mit zwei Argon-Ionen-Lasern ausgestattet mit einer Wellenlänge von 488 nm (blau) und 635 nm (rot). Die zu untersuchenden Zellen befinden sich in einem Hüllstrom (FACSSort™) und werden als Einzelzellen nacheinander aufgereiht und so im rechten Winkel an einer Photoküvette vorbeigeführt. Das gestreute Licht kann von Sammellinsen gebündelt werden. Hierdurch können Vorwärtsstreuung (FSC = Forwardscatter), Seitwärtsstreuung (SSC = Sidescatter) sowie Fluoreszenzsignale ermittelt werden.

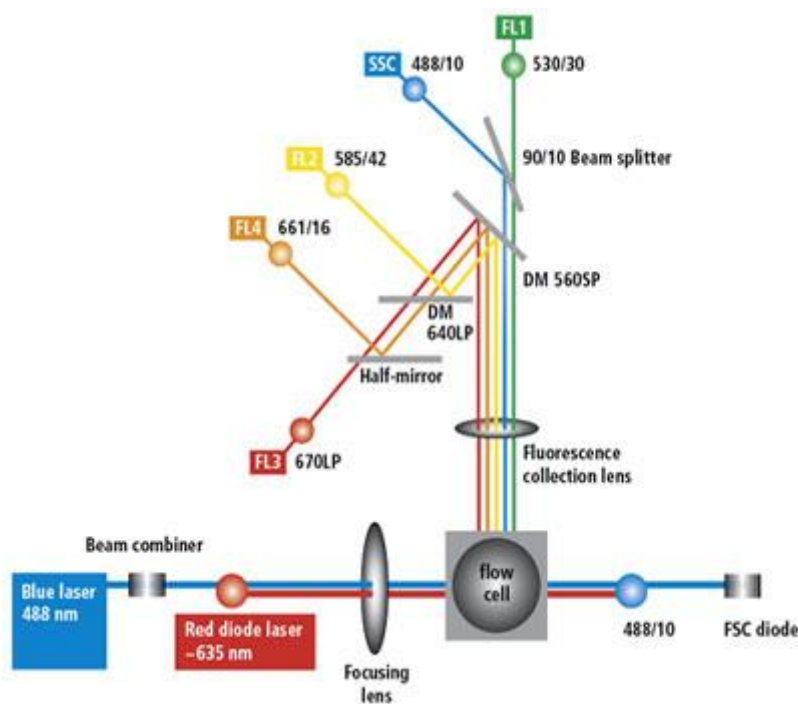


Abbildung 2: Schematische Darstellung des optischen Systems des BD FACSCalibur™ 55

Mit Hilfe eines Flüssigkeitssystems werden die Zellen in die Messküvette geleitet. Die Optik der Anregung besteht aus einem luftgekühlten Argonlaser (488 nm) und einem Dioden-Laser (635 nm). Prismen (Beam Expander) bilden und Linsen fokussieren den Laserstrahl. Eine Sammellinse sammelt das

emittierte Licht in einem 90°-Winkel. Farbteilerspiegel und Filter weisen die entsprechenden Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den dazugehörigen optischen Detektoren, welche die optischen Signale in elektronische Signale umwandeln. Das FSC korreliert mit der Zellgröße. Hierbei gilt: Je größer der Durchmesser, desto stärker die Absorption, das heißt die Abschwächung des Lasers.

Die SSC korreliert wiederum mit der Granularität bzw. dem Plasma/ Kern-Verhältnis der Zellen. Je mehr Partikel/ Zellorganellen sich in einer Zelle befinden, desto stärker wird das Licht beim Durchtritt durch die Zelle gestreut, d. h. die Streuung des Lichtes ist proportional zur Granularität der Zelle.

So lassen sich große Zellen mit großer Plasma-/ Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) abgrenzen. Monozyten zeigen ein intermediäres Verhalten. Die Granulozyten wurden bei dieser Arbeit bereits zuvor bei der Aufarbeitung des Blutes mit Ficoll aussortiert.

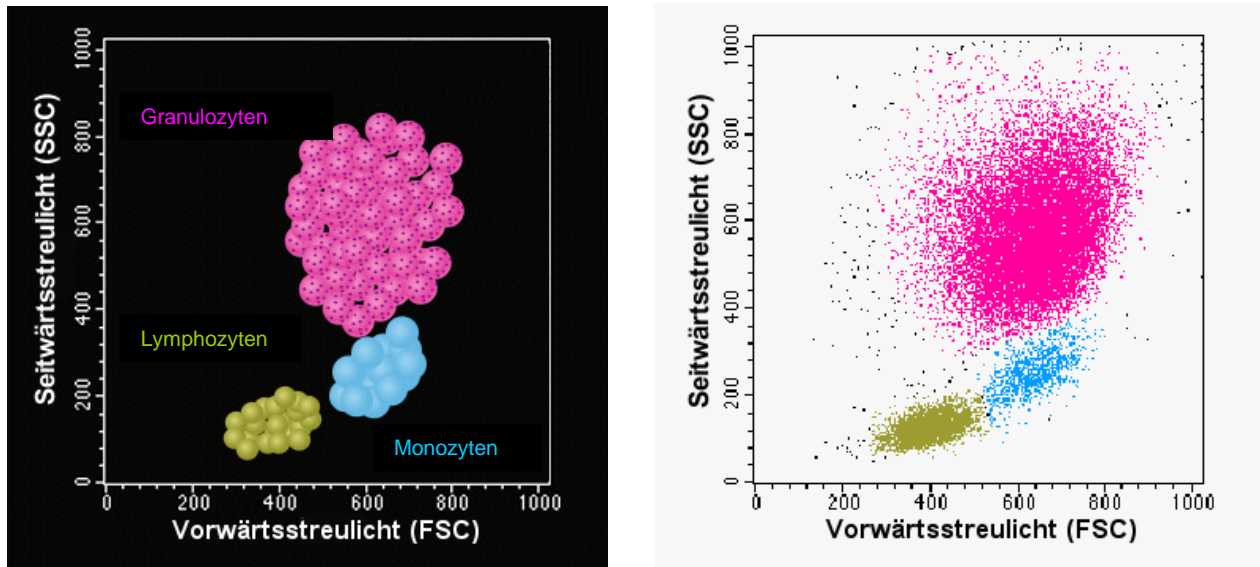
Fluorochrome sind chemische Verbindungen, die durch einen Laser definierter Wellenlänge angeregt werden (Exzitation) und daraufhin Licht einer längerwelligen Wellenlänge emittieren (Emission). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in dieser Arbeit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Peridin-Chlorophyll (PerCP) und Phycoerythrin (PE) verwendet.

Fluorochrom	Anregung (nm)	Emission (nm)
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	488	519
Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	488	677
Phycoerythrin (PE)	488	578

**Tabelle 4: Verwendete Fluorochromkonjugate mit dazugehörigen Anregungs- und Emissionsspektren**

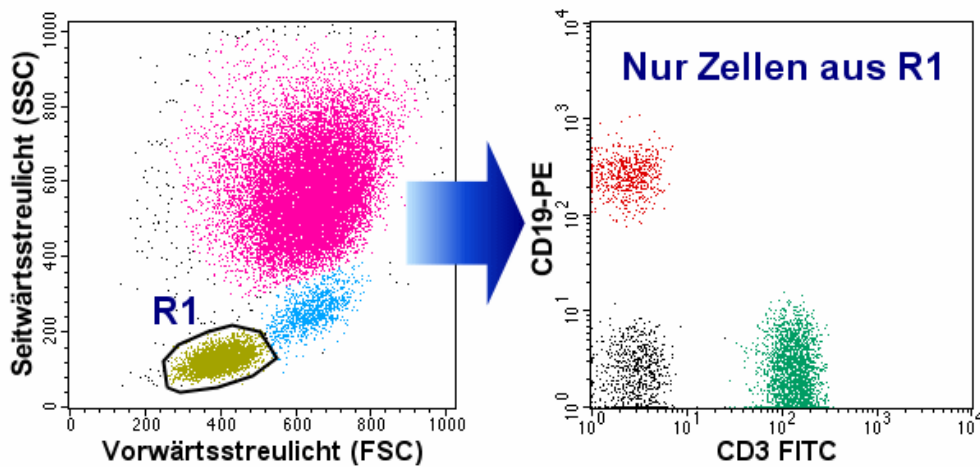
Erreichen die Fluoreszenzfarbstoffe ihr ursprüngliches Energieniveau, senden die Licht aus, welches von Fotodioden aufgefangen und vermehrt wird. Das Programm Cellquest™ stellt diesen Vorgang graphisch dar. In unseren Untersuchungen wurden Streudiagramme (Scatterplots) erstellt,

zweidimensionale Erweiterungen des Histogramms - auch Streubild genannt. Hierin lassen sich unterschiedliche Leukozytenpopulationen getrennt darstellen. In den Punktwolkendiagrammen (Dot-Plots) entspricht jeder Punkt im Diagramm einer Zelle (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Streulicht-Dot-Plot (schematische und reale Darstellung)**  
 modifiziert nach <http://www.med4you.at>

In der Darstellung FSC gegen SSC erfolgte dann die Diskriminierung der Lymphozytenpopulation sowie das „Gating“ (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Gating (Schleusen)**  
 modifiziert nach <http://www.med4you.at>

Der **Enzymimmunoassay** (ELISA, Enzym-linked-immunoabsorbent-assay) ist eine quantitative Methode zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern, welche enzymatisch markiert werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF in den Zellkulturüberständen mittels Doppelsandwich-ELISA. Beim Sandwich-ELISA wird die Antigenkonzentration zwischen zwei Lagen von Antikörpern gemessen. Hierbei ist der Antikörper an die feste Phase gebunden. Ein zweiter Detektionsantikörper bindet unter Bildung eines „Sandwich“ an das Antigen und die Menge des gebundenen Antigens kann ermittelt werden.

Hierzu verwendet man Mikrotiterplatten, deren Böden mit einem spezifischen Antigen oder Antikörper beschichtet sind. In die Vertiefungen gibt man das zu testende Serum und inkubiert den Ansatz, damit eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden kann. Dann wäscht man alle nicht-gebundenen Antigene oder Antikörper ab. Die Antigen-/Antikörper-Komplexe werden mit einem zweiten Antikörper, der Enzym-markiert ist (Peroxidans) und den Komplex bindet, sichtbar gemacht.

Sind Antikörper bzw. Antigen-/Antikörper-Komplexe vorhanden, so kann der Antikörper binden. Gibt man einen Farbindikator hinzu, so wird die Farbe enzymatisch verändert. Daraufhin kann die photometrische Messung erfolgen. Um eine quantitative Aussage über die Antikörper-Konzentration treffen zu können, setzt man reziproke Verdünnungen des Serums an.

Eine der Grundlagen für die Auswertung des Zytokin-ELISA ist das TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>-Konzept<sup>56</sup>, laut welchem die Stimulierung von TH<sub>1</sub>-Lymphozyten mit PPD zu einer Bildung von Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) führt ohne hierbei auf eine Hinzugabe von Tetanol zu reagieren. TH<sub>2</sub>-Lymphozyten reagieren hingegen nach Stimulierung durch Tetanol mit einer vermehrten Ausschüttung von Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-13 ohne auf PPD zu reagieren. Ein sogenannter Mischtyp (Typ1/Typ2-Profil) liegt bei gleichzeitiger Reaktion der Zellen gegenüber PPD und Tetanol vor<sup>57</sup>.

In dieser Arbeit wurden die Zytokine IL-1- $\alpha$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  in den Zellüberständen gemessen.

## 1.3 Ribavirin

### 1.3.1 Geschichtlicher Überblick

Als eines der ältesten Virustatika wurde Ribavirin 1972 entdeckt bei der Suche nach Ribonukleosiden, die gegen ein breites Virenspektrum wirken<sup>58</sup>. Ursprünglich war die Substanz für die orale Behandlung von Influenza-A/B-Infektionen gedacht, aber Studien zeigten einen nur mäßigen Erfolg. Zur systemischen Gabe ist Ribavirin in den USA seit 1972 verfügbar, seit 1986 ist es von der FDA auch zur Aerosol-Behandlung zugelassen.

### 1.3.2 Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität

Ribavirin (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid; Summenformel  $C_8H_{12}N_4O_5$ ; Handelsnamen Copegus<sup>®</sup>, Rebetol<sup>®</sup>, Virazid, Virazol<sup>®</sup>) ist ein Guanosinanalogon (Abbildung 5), welches *in vitro* und *in vivo* die Replikation vieler DNA- und RNA-Viren hemmt. In der klinischen Anwendung wird es nur gegen RNA-Viren eingesetzt. Ribavirin ist eine farb-, geruchs- und geschmacklose kristalline Substanz, gut wasserlöslich und bei Raumtemperatur stabil.

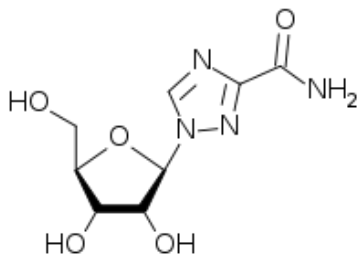


Abbildung 5: Ribavirin (Strukturformel) 59

Pharmakodynamik:

In der Zelle wird Ribavirin triphosphoryliert, wirkt aber in der Mehrzahl der in vitro untersuchten Systeme nicht oder nur teilweise durch Inhibition der viralen Nukleinsäure-Polymerasen.

Derzeit werden zumindest fünf verschiedene Mechanismen diskutiert, die der Ribavirin-vermittelten Hemmung zu Grunde liegen. Dabei werden direkte antivirale Effekte von indirekten, immunmodulatorischen unterschieden. Die meisten Befunde wurden bei Studien im Zusammenhang mit der chronischen Hepatitis C erhoben.

#### 1. Reduktion des intrazellulären GTP-Spiegels

Ribavirin ist ein Strukturanalogon von Guanosin und hemmt das zelluläre Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das für die Synthese von Guanosin-Monophosphat benötigt wird<sup>60</sup>. Ribavirin-Monophosphat hemmt dieses Enzym kompetitiv ( $K_i = 250 \text{ nmol}$ ), wodurch es zu einer Reduktion der intrazellulären GTP-Konzentration kommt.

Es wird vermutet, dass die Replikation vieler RNA-Viren von der GTP-Konzentration in der Zelle abhängt. Dagegen spricht allerdings, dass IMPDH-Inhibitoren anderer Struktur (z. B. Mycophenolat (Mofetil<sup>®</sup>), Merimepodib) bei HCV keine virostatistische Wirkung zeigen, obwohl sie eine Reduktion des GTP-Spiegels bewirken<sup>61</sup>.

#### 2. Hemmung des „capping“

Ribavirin kann aufgrund seiner Strukturähnlichkeit mit Guanosin auch Enzyme hemmen, die für das „capping“ verantwortlich sind.

Die Cap-Struktur ist eine chemische Veränderung an mRNA-Molekülen in Eukaryonten, die die Stabilität der RNA erhöht und wichtig ist für den Transport der RNA aus dem Kern in das Cytoplasma und die nachfolgende Translation der mRNAs durch die Ribosomen. Dabei wird ein 7-Methylguanosin an das 5'-Phosphat-Ende der mRNA über eine 5'-5'-Triphosphat-Verbindung geknüpft.

Das Kernstück der cap-Struktur ist ein GTP. Das Hinzufügen des GTPs und dessen nachträgliche Veränderung durch Methylierung wird durch Guanylyltransferasen und Methylasen katalysiert. Ribavirin scheint diesen Vorgang kompetitiv zu hemmen. Diese These unterstützt die Beobachtung, dass Viren ohne diese cap-Struktur nur gering auf Ribavirin ansprechen. Außerdem wurde bei Resistenzstudien mit dem Sindbisvirus (ein Alphavirus aus der Familie der *Togaviridae*) eine Mutation gefunden, die die viruseigene Guanylyltransferase so verändert, dass sie GTP mit höherer Affinität bindet als das Wildtypenzym und damit besser zwischen GTP und Ribavirin diskriminiert<sup>62</sup>.

### 3. Induktion von Hypermutationen

Ribavintriphosphat wird in die virale RNA inkorporiert. Diese Inkorporation führt jedoch nicht zum Abbruch der RNA-Synthese, sondern dazu, dass aufgrund der Ähnlichkeit des Ribavirinmoleküles mit dem Guanodin- und dem Adenosinmolekül entweder ein Uridin (ursprüngliches Nukleotid) als entsprechende Base oder ein Cytidin (Mutation) in den Gegenstrang synthetisiert wird (siehe Abbildung 6B). Somit kommt es zu einer Anhäufung von in ihrer Replikationsfähigkeit eingeschränkten Mutanten.

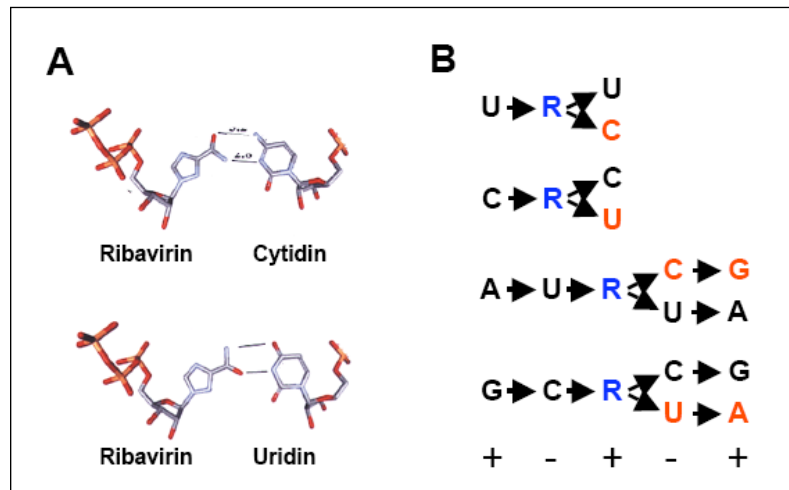
In Abhängigkeit von der Konzentration kommt es zu einer entsprechend häufigen Inkorporation von Ribavirin in die neusynthetisierte RNA und damit zu einer analogen Steigerung der Mutationsrate.

Diese Beobachtungen konnten bei *In-vitro*-Studien an Polioviren bestätigt werden. Obwohl die absolute Menge an Poliovirus durch die Ribavirinbehandlung der infizierten Zellen nicht vermindert wurde, war die Infektiosität der Nachkommenviren infolge der gesteigerten Mutationsrate deutlich reduziert<sup>63</sup>.

Einschränkend ist zu bemerken, dass die Effekte erst bei sehr hohen Ribavirinkonzentrationen auftraten. So war eine Behandlung mit 1mM Ribavirin erforderlich, um die Mutationsrate des Poliovirus um das Sechsfache zu steigern. Es ist unklar, ob diese Konzentrationen *in vivo* erreicht werden und inwieweit Ribavirin auf diesem Weg mit der Virusreplikation interferiert.



Analoge Untersuchungen bei HCV mit unterschiedlichen Zellkulturmodellen weisen darauf hin, dass Ribavirin auch bei diesem Virus eine Hypermutation induzieren kann. So wurde beispielsweise in Ribavirin-behandelten Replikonzellen eine Erhöhung der Mutationsrate beobachtet. Dieser Vorgang konnte allerdings in klinischen Studien an Patienten mit einer chronischen HCV bisher nicht nachgewiesen werden<sup>64</sup>.



**Abbildung 6: (A) Modell der Basenpaarungsmöglichkeiten von Ribavirintriphosphat mit Cytidin oder nach Rotation der Carboxamidgruppe mit Uridin. (B) Induktion von Hypermutationen bei einem Plusstrang-RNA-Virus (z. B. HCV).**

Links ist jeweils das Nukleotid im viralen Plusstranggenom dargestellt. Ribavirin (R) kann während der Synthese des Minusstrangs (obere beide Möglichkeiten) oder bei der Synthese eines neuen Plusstrangs inkorporiert werden (darunter dargestellt). Das Ergebnis ist eine U-C bzw. C-U oder G-A bzw. A-G Transition. Falsch eingebaute Nukleotide (Mutationen) sind rot dargestellt. Die Polarität des RNA-Strangs ist unten angegeben.

#### 4. Direkte Hemmung der viralen RNA-Polymerase

Ribavirin kann die RNA-Polymerasen verschiedener Negativstrang RNA-Viren, wie beispielsweise das Influenzavirus, hemmen<sup>65</sup>. Daneben wurde eine Hemmung der Reversen Transkriptase von HIV<sup>66</sup> sowie der RNA-abhängigen RNA-Polymerase von HCV beschrieben<sup>67</sup>. Eine Wirksamkeit bei HIV/HBV koinfizierten Patienten konnte in klinischen Studien jedoch nicht belegt werden<sup>68</sup>. Auch bei der chronischen HCV wird angenommen, dass Ribavirin nicht über eine direkte Hemmung der RNA-Polymerase wirkt. Zwar wurde in der Ribavirin Monotherapie eine moderate (maximal 10-fache) Reduktion der Virämie beobachtet; diese war jedoch nur zwischen Tag zwei und vier nach Beginn der Therapie zu beobachten, wonach die Virämie wieder auf die Ausgangswerte anstieg<sup>69</sup>.

In einer Studie an Patienten unter einer Ribavirin-Monotherapie wurde eine Mutation in der NS5BRNA-Polymerase gefunden, die zu einem konservativen Aminosäureaustausch in der Daumendomäne der Polymerase (F415Y) führt<sup>70</sup>. Obwohl Studien mit dem HCV-Replikonmodell darauf hinweisen, dass diese Mutation eine sehr moderate Resistenz gegen Ribavirin bedingt, ist unklar, wie diese Resistenz angesichts der Art der Mutation und deren Lage innerhalb der Struktur der Polymerase vermittelt werden soll. Darüber hinaus ist diese Aminosäureposition polymorph und die meisten HCV-Isolate vom Genotyp 1a und 6a haben natürlicherweise ein Phenylalanin an dieser Position, was der Resistenzmutation entspräche.

#### 5. Modulation der Immunantwort

Es konnte nachgewiesen werden, dass Ribavirin in stimulierten humanen T-Zellen das Zytokinprofil so verändert, dass es primär zur Sekretion von TH<sub>1</sub>-Zytokinen kommt wie etwa IL-2 oder TNF- $\alpha$ <sup>71,72,73</sup>, die die zelluläre Immunantwort begünstigen.

Demgegenüber hemmt Ribavirin die Produktion von TH<sub>2</sub>-Zytokinen, welche die humorale Immunantwort begünstigen. Es wird deshalb vermutet, dass Ribavirin zumindest bei der chronischen Hepatitis C neben den möglichen direkt-antiviralen Effekten durch Beeinflussung der Immunreaktion in Richtung T-Zellantwort deutlich zum therapeutischen Nutzen beiträgt<sup>74</sup>.

#### Pharmakokinetik:

Ribavirin wird nach oraler Einnahme zu 50 % im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Es findet keine Bindung an Plasmaproteine statt. Nur ca. 10 % einer Dosis werden unverändert mit den Fäzes ausgeschieden. Es wird durch ein membranständiges Transportsystem aus dem Serum in das Zellinnere aufgenommen, auch in Erythrozyten.

Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt jedoch circa 45 bis 65 %. Dies scheint auf einen First-Pass-Metabolismus zurückzuführen zu sein.

Die Metabolisierung führt zu Produkten, die renal ausgeschieden werden.

Ribavirin und seine Metabolite akkumulieren besonders in der Leber und den Erythrozyten.

### **1.3.3 Klinische Anwendung**

Ribavirin wurde in Aerosolform zur Inhalationsbehandlung bei Infektionen mit dem respiratorischen Syncytialvirus (RSV), das eine Bronchiolitis oder eine Pneumonie verursachen kann, eingesetzt. Es war allerdings nur für schwere Verläufe zugelassen und für Säuglinge und Kinder, bei denen ein erhöhtes Risiko bestand. Zudem wurde Ribavirin bei Infektionen mit dem Lassa Fieber Virus und dem West-Nil Virus eingesetzt.

Über viele Jahre wurde Ribavirin in der Therapie der chronischen Hepatitis C verwendet. Hierbei blieb der genaue Wirkungsmechanismus bis heute unbekannt. Aktuell wird Ribavirin nur noch in Kombinationstherapien zur Behandlung der chronischen Hepatitis C bei vorbehandelten Erwachsenen angewendet.

Aktuell gibt es erste Studien über den Einsatz von Ribavirin zur Therapie einer Covid-19-Erkrankung. So wurde gezeigt, dass eine Dreifachkombination aus Lopinavir/Ritonavir und Interferon beta-1b und Ribavirin bessere Behandlungsergebnisse erzielen konnte als eine Zweifachkombination aus Lopinavir plus Ritonavir<sup>75</sup>.

### **1.3.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung**

Nebenwirkungen von Ribavirin bei lokaler Anwendung sind recht häufig Hautirritationen und Bronchospasmen.

Bei systemischer Zufuhr ist die Möglichkeit einer extravasalen Hämolyse zu beachten. Ribavirin sollte deshalb bei Patienten mit hohem Risiko für einen Herzinfarkt, schweren pulmonalen Erkrankungen, Anämie oder einer Hämoglobinopathie nicht gegeben werden. Des Weiteren kann es zu einer Knochenmarksuppression kommen. Recht häufig kommt es zu Haarausfall, Gewichtsverlust, Müdigkeit und Depression unter Ribavirintherapie. Weiterhin

können Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen, Übelkeit, Aggressivität, Migräne, Mundtrockenheit etc. auftreten. Im Tierversuch ist Ribavirin teratogen.

Da Ribavirin über die Niere ausgeschieden wird und ein großes Verteilungsvolumen mit langer kumulativer Halbwertszeit hat, kann es nicht durch eine Hämodialyse eliminiert werden. Patienten mit Niereninsuffizienz (Kreatinin < 50 ml/min) sollten deshalb nicht mit Ribavirin behandelt werden.

## **1.4 Amantadin**

### **1.4.1 Geschichtlicher Überblick**

Amantadin wird seit den 60er Jahren zur Prophylaxe und Behandlung der Influenza A eingesetzt<sup>76,77</sup>. 1969 wurde bei einer Parkinsonpatientin, die aufgrund einer Grippeprophylaxe mit Amantadinhydrochlorid behandelt wurde, zufällig entdeckt, dass sich ihre Parkinsonsymptomatik verbesserte. Hierauf wurden zahlreiche Studien durchgeführt, welche eine positive Beeinflussung der Parkinsonsymptome belegten<sup>78,79,80</sup>.

In den folgenden Jahren wurde das Einsatzspektrum von Amantadin kontinuierlich erweitert. So wird Amantadin aktuell in der Therapie des medikamentös induzierten Parkinsonismus, der Neuroleptika induzierte Dyskinesien<sup>81</sup>, der Multiple Sklerose assoziierte Fatigue<sup>82</sup>, der L-Dopa induzierten Dyskinesien<sup>83</sup>, des Neuroleptischen malignen Syndroms und der akinetischen hyperthermen Parkinsonkrise<sup>84</sup> eingesetzt.

In den 90er Jahren fanden vermehrt Studien zur Wirksamkeit von Amantadin in der Hepatitis-C-Therapie statt<sup>85,86,87</sup>. Der Wirkmechanismus von Amantadin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C wirkt ist bisher nicht bekannt.

### **1.4.2 Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität**

Amantadin (1-Adamantamin, AMA; Summenformel C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N; Handelsname Symmetrel®) ist ein trizyklisches Amin (siehe Abbildung 7), welches von Adamantan abstammt und ist ein wasserlösliches, kristallines Pulver.

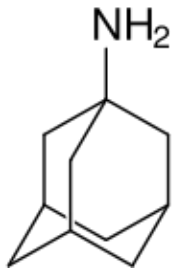


Abbildung 7: Amantadin (Strukturformel) 88

#### Pharmakodynamik:

Bei der Behandlung des Morbus Parkinson hemmt Amantadin über einen niedrig-affinen, nicht-kompetitiven Antagonismus den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor<sup>89,90,91,92</sup>. Dadurch werden unter anderem nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren blockiert<sup>93</sup> und somit die Freisetzung von Acetylcholin aus striatalen Interneuronen *in vitro* reduziert<sup>94,95,96</sup>.

Zudem wirkt Amantadin indirekt agonistisch auf das zentrale dopaminerge System. *In vitro*<sup>97,98</sup> und *in vivo*<sup>99</sup> hemmt Amantadin die präsynaptischen Dopamin-Wiederaufnahme und bewirkt eine Freisetzung von Dopamin auf striatalen dopaminergen Nervenendigungen<sup>100,101,102,103</sup>, wodurch die extrazelluläre Dopamin-Konzentration ansteigt<sup>104</sup>. Amantadin besitzt über eine gesteigerte Freisetzung von Noradrenalin eine antidepressive Wirkung<sup>105,106,107</sup>.

In der Influenza-A-Virus-Therapie wirkt Amantadin über die Hemmung der Virusreplikation<sup>108</sup>. Amantadin verhindert die Fusion von Virus- und Endosomenmembran. Das Influenza-A-Virus gehört zu den Viren, die durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle gelangen, die somit beim „uncoating“ erst durch eine säureabhängige Dissoziation der endozytotischen Verpackung ihre Nukleinsäure, in diesem Falle eine single-stranded(-)-RNA, frei bekommen. Das antiviral wirksame Amantadin verhindert indirekt die Freisetzung der viralen Ribonukleinsäure dadurch, dass es den Verschmelzungsprozess zwischen dem viralen M2-Matrixprotein und der Endosomenmembran verhindert. Das M2-Protein funktioniert als ein Ionenkanal, der durch Amantadin blockiert wird<sup>109</sup>. Diese Blockade führt zudem zu einer gestörten pH-Regulation<sup>110</sup>.

Immunmodulation:

Amantadin besitzt außerdem eine immunmodulatorische Wirkung. So führt es zu einem Anstieg der IL-10-Produktion und hemmt die Bildung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , hemmt also die Proliferationsaktivität von T-Zellen<sup>111,112,113</sup>.

Pharmakokinetik:

Amantadin wird nach oraler Gabe rasch und nahezu vollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und zu ca. 70 % an Plasmaproteine gebunden. Es wird unverändert (zu ca. 90 %) renal ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt etwa 15 Stunden.

### 1.4.3 Klinische Anwendung

Amantadin wurde in den frühen 2000ern zur Prophylaxe der Influenza-A<sub>2</sub>-Virusinfektion bei Risikopatienten und gesicherter Influenza-A<sub>2</sub>-Epidemie eingesetzt. Zwischenzeitlich haben sich starke Resistenzen entwickelt<sup>114</sup>, sodass Amantadin aktuell nur noch zur Behandlung des Morbus Parkinson sowie zur Behandlung von durch Neuroleptika und ähnlich wirkende Arzneimittel bedingte extrapyramidale Symptome verwendet wird (s. o.).

Bisher ist der genaue Wirkmechanismus von Amantadin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nicht bekannt. *In vitro* wurde eine dosisabhängige Hemmung der HCV-Replikation durch Amantadin beobachtet<sup>115</sup>. Die vielversprechenden Ergebnisse einer klinischen Studie zur Amantadin-Monotherapie bei IFN- $\alpha$ -Non-Responder-Patienten mit chronischer Hepatitis C mit Anprechraten von bis zu 20 %<sup>116</sup> konnten in Folgestudien nicht bestätigt werden. Weitere nicht-placebokontrollierte Studien zur Kombinationstherapie von IFN- $\alpha$  plus Amantadin zeigten eine Überlegenheit dieser Kombination, verglichen mit einer IFN- $\alpha$ -Monotherapie<sup>117,118</sup>. In der bisher einzigen placebokontrollierten Studie zur Kombinationstherapie von IFN- $\alpha$  plus Amantadinsulfat<sup>119</sup> bei unvorbehandelten Patienten konnte allerdings kein verbesserter antiviraler Effekt durch Amantadin nachgewiesen werden.

Daten zur Triple-Therapie, bestehend aus IFN- $\alpha$ , Ribavirin und Amantadin bei IFN- $\alpha$ -Non-Responder-Patienten, zeigten widersprüchliche Ergebnisse<sup>120,121,122</sup>.

Amantadin ist kontraindiziert in der Schwangerschaft, da im Tierversuch teratogene Wirkung beobachtet wurde, obwohl diese Beobachtungen beim Menschen bisher nicht bestätigt wurden.

Aktuell gibt es einzelne Fallstudien in Mexico und Spanien, welche erwiesen, dass Covid-19-Patienten, die mit Amantadin behandelt wurden, schneller genesen sind bzw. keine schweren Symptome entwickelten im Vergleich zur Placebo-Gruppe<sup>123</sup>. Eine deutsche Forschergruppe fand zuletzt heraus, dass Amantadin SARS-COV-2 *in vitro* hemmt<sup>124</sup>.

#### **1.4.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung**

Die Nebenwirkungen von Amantadin äußern sich initial in gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit, Inappetenz und Obstipation. Daneben werden v.a. toxische Effekte von Seiten des Zentralnervensystems beobachtet. Bei höherer Dosis sind es insbesondere Nervosität, Ataxie, Verwirrtheit, Halluzinationen, psychoseartige Zustände, Depressionen, Konvulsionen und Koma. Außerdem können atropinartige Effekte auftreten wie Mundtrockenheit, Herzklopfen und Harnretention. Zu beachten sind mögliche Wirkungsverstärkungen von Sympathomimetika und Pharmaka mit anticholinergen Wirkungen.

### **1.6 Ziel und Fragestellung der Arbeit**

Es ist bekannt, dass Ribavirin und Amantadin einen modulatorischen Effekt auf immunkompetente Zellen des menschlichen Körpers haben, wobei hierüber vor allem für Amantadin wenige Studien vorliegen. In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von Ribavirin und Amantadin auf humane Zellen des erworbenen Immunsystems (B-Zellen, T-Helferzellen und T-Killerzellen) sowie auf Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) *in vitro* näher untersucht werden. Hierbei wird besonderes Augenmerk auf TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Reaktionen gelegt, bei denen unterschiedliche Zytokinprofile vorliegen und die auf bestimmten Aktivierungskaskaden beruhen.

Zur näheren Untersuchung der Wirkung von Ribavirin und Amantadin auf immunkompetente Zellen wurden in einem Versuchskollektiv von 20 gesunden Probanden folgende Testverfahren angewandt:

- PBMC-Isolierung aus Vollblut.
- Anschließende Kultivierung der gewonnenen Zellen und Inkubation mit unterschiedlichen stimulierenden Antigenen (BCG, Tetanus-Toxoid und PPD) mit und ohne Zugabe von verschiedenen Ribavirin- und Amantadinkonzentrationen. Die kostimulierenden Antigene sollten hierbei TH<sub>1</sub>- bzw. TH<sub>2</sub>-Immunreaktionen hervorrufen.
- Zellproliferationsbestimmung mittels radioaktivem Proliferationsassay.
- Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression des frühen spezifischen Aktivierungsmarkers CD69 und verschiedener Zelloberflächenmoleküle (CD4, CD8, CD19 und CD56).
- Quantitative Zytokinbestimmung mit Hilfe des Zytokin-ELISAs.
- Untersuchung der Kinetik der Immunreaktionen auf Ribavirin und Amantadin, um eventuell weitere Rückschlüsse auf deren Wirkungsweise ziehen zu können.
- Zeigen des Einflusses von Ribavirin und Amantadin in verschiedenen Konzentrationsstufen auf die Zellen der erworbenen Immunantwort *in vitro*.



## 2. Probanden, Materialien und Methoden

### 2.1 Probanden

Untersucht wurden neun männliche und elf weibliche Personen im Alter zwischen 18 und 48 Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. Die gesunden Probanden wurden zufällig gewählt. Das Probandenkollektiv bestand aus Studenten, medizinischem Personal, Angehörigen und Mitarbeitern des immunpathologischen Labors. Als Ausschlusskriterien galten eine akute Infektionskrankheit und/ oder ein akutes allergisches Geschehen. Einige der Probanden wiesen Gräser- und Pollenallergien in der Anamnese auf. Bei keinem Spender war ein angeborener oder erworbener Immundefekt bekannt. Kein Spender hatte in den letzten zwölf Monaten eine Tetanus- oder BCG-Impfung erhalten. Nach den oben genannten Kriterien wiesen in dieser Studie acht der Probanden ein Th0-, drei ein Th1-, und neun ein Th2- Profil auf.

### 2.2 Material, Reagenzien, Medien und Geräte

#### 2.2.1 Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Reagenzien	Hersteller
Heparin-Natrium-5000 ratiopharm <sup>®</sup> Amp.	Injektionslösung 5000 IE <i>Ratiopharm GmbH, Ulm</i>
RPMI-1640 Medium (1x)	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 25 mM HEPES, 5,5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenolrot <i>Biochrom AG, Berlin</i>
Zu RPMI-1640 Medium wurden stets 100 mg/l Refobacin <sup>®</sup> als Breitbandantibiotikum hinzugefügt.	
Refobacin <sup>®</sup>	Wirkstoff: Gentamicinsulfat <i>Merck Pharma GmbH, Darmstadt</i>
HBSS (1x)	Hanks' Balanced Salt Solution w/o MgCl <sub>2</sub> , w/o Ca <sup>Cl</sup> <sub>2</sub> <i>GIBCO/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Biocoll separating solution (Ficoll <sup>®</sup> )	Dichte: 1,077 g/ml <i>Biochrom AG, Berlin</i>
Acridin-Orange	Merck, Darmstadt

Tabelle 5: Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

#### 2.2.2 Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT)

Reagenzien	Hersteller
[Methyl- <sup>3</sup> H-] Thymidin 74 GBq/ mmol	<i>Hartmann Analytic, Braunschweig</i>
ULTIMA Gold	Szintillationsflüssigkeit

	Packard, Frankfurt/ Main
--	--------------------------

Tabelle 6: Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT)

### 2.2.3 Reagenzien für die FACS-Analyse

Reagenzien	Hersteller
PBS-Puffer	eigene Herstellung: 6,81 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 43,83 g NaCl + 44,49 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 5000 ml $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ ; 60 mM; pH 7,4
BSA	Bovine Serum Albumin (Fraktion V) <i>Boehringer, Mannheim</i>
Waschpuffer	eigene Herstellung: 1 x PBS + 0,05% BSA; pH 7,4
BD CellFIX™	10 x Konzentrat <i>BD Biosciences, Heidelberg</i>

Tabelle 7: Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie

Isotyp-Kontrollen	Hersteller
Mouse-IgG1, $\kappa$ Anti-Human FITC Mouse-IgG1, $\kappa$ Anti-Human PE Mouse-IgG1, $\kappa$ Anti-Human PerCP	<i>BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg</i>
Antikörper für die Detektion CD69-exprimierender Zellen	
FASTIMMUNE™ CD4/CD69/CD3 FASTIMMUNE™ CD8/CD69/CD3 FASTIMMUNE™ CD19/CD69/CD45 FASTIMMUNE™ CD56/CD69/CD45	CD4 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP CD8 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP CD19 FITC, CD69 PE, CD45 PerCP CD56 FITC, CD69 PE, CD45 PerCP <i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>

Tabelle 8: Antikörper für die FACS-Analyse

### 2.2.4 Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-ELISA

Reagenzien	Hersteller
PBS-Puffer	eigene Herstellung: 6,81 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 43,83 g NaCl + 44,49 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 5000 ml $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ ; 60 M; pH 7,4
BSA	Bovine Serum Albumin (Fraktion V) <i>Boehringer, Mannheim</i>
Waschpuffer	eigene Herstellung: 1 x PBS + 0,05% BSA;

	pH 7,4
Bicarbonat-Puffer	33,90 g NaCO <sub>3</sub> + 57,12 g NaHCO <sub>3</sub> + 5000 ml Aqua <sub>dest</sub> ; 0,2 M; pH 9,6
Citrat-Puffer	82,36 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> * 2H <sub>2</sub> O) + 25,20 g Citronensäure-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * H <sub>2</sub> O) + 4000 ml Aqua <sub>dest</sub> ; 0,1 M; pH 5,0
Substrat-Lösung	0,5 mg o-Phenyldiamin/ ml Citratpuffer 33 l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)/ 100 ml Puffer
Avidin-Peroxidase	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
25%-ige Schwefelsäure	<i>Merck, Darmstadt</i>

Tabelle 9: Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-ELISA

## 2.2.5 Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA

Reagenzien	Hersteller
IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$	<i>BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg</i>

Tabelle 10: Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA

## 2.2.6 Antikörper für den Zytokin-ELISA

Reagenzien	Hersteller
Mouse Anti-Human IL-1 $\alpha$ Detektions-Antikörper, Rat Anti-Human IL-5, Rat Anti-Human IL-6, Rat Anti-Human IL-10, Rat Anti-Human IL-13, Rat Anti-Human GM-CSF, Mouse Anti-Human IFN- $\gamma$ , Mouse Anti-Human TNF- $\alpha$ , Mouse Anti- Human TNF- $\beta$ , Biotin Rat Anti-Mouse IL-5, Biotin Rat Anti-Mouse IL-6, Biotin Rat Anti- Mouse IL-10, Biotin Rat Anti-Mouse IL-13, Biotin Rat Anti-Mouse GM-CSF, Biotin Mouse Anti- Human IFN- $\gamma$ , Biotin Mouse Anti-Human TNF- $\alpha$ , Biotin Mouse Anti-Human TNF- $\beta$	<i>BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg</i>

Tabelle 11: Antikörper für den Zytokin-ELISA

## 2.2.7 Antigene

Reagenzien	Hersteller
BCG-medac	2 x 10 <sup>8</sup> – 3 x 10 <sup>9</sup> Einheiten von BCG (Bacillus Calmette-Guérin; Stamm RIVM);

	Pulver <i>medac GmbH, Wedel</i>
Tetanol <sup>®</sup> pur	Konservierungsmittelfreier Tetanus-Toxoid-Absorbat-Impfstoff; mindestens 40 IE/ 0,5 ml <i>Chiron Vaccines Behring, Marburg</i>
Tuberkulin PPD RT 23 SSI	0,4 µg Tuberkulin PPD/ ml <i>Statens Serum Institute</i>
Pokeweed Mitogen (PWM)	0,4 mg Protein/ Flasche <i>Biochrom AG, Berlin</i>

Tabelle 12: Antigene

## 2.2.8 Medikamente

Reagenzien	Hersteller
Amantadin-Serag <sup>®</sup>	Wirkstoff: Amantadinhemisulfat 0,04% in isotonischer Kochsalzlösung (Infusion) <i>Serag-Wiesser, Naila</i>
Rebetol <sup>®</sup>	Wirkstoff: Ribavirin 40 mg/ ml; Lösung zum Einnehmen <i>essex pharma, München</i>

Tabelle 13: Medikamente

## 2.2.9 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material/ Gerät	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	<i>Forma Scientific, Göttingen</i>
Combi Cell Harvester	<i>Skatron, Norderstedt</i>
Durchflusszytometer	FACSCalibur <sup>™</sup> <i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml <i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
ELISA-Reader	<i>SLT, Salzburg, Österreich</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>Ernst Leitz, Wetzlar</i>
Glasfiberfilter	<i>Wallac, Freiburg</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Assistent, Sondheim</i>
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1000 µl <i>Eppendorf, Hamburg</i>
Plattenszintillationszähler	1205 Betaplate <sup>®</sup> <i>Wallac, Freiburg</i>
Reaktionsgefäße	1,5 ml, konisch, mit Stehrand <i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Rundbodenröhrchen	5 ml, BD Falcon <sup>™</sup> <i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Zellkulturplatte	1. Cellstar <sup>®</sup> , 24 well, steril <i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>

	2. Nunclon™, 96 well, steril <i>Nalge Nunc International, Wiesbaden</i>
Zellkulturröhrchen	Cellstar®, 12ml, steril <i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Zentrifugenröhrchen	Blue Max™ 50 ml, konisches Röhrchen, Polypropylen <i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Zentrifuge	Rotixa <i>Hettich, Tuttlingen</i>

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und Geräte

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Serumgewinnung

Den Probanden wurden 120 ml venöses Blut entnommen, dem 25 IE Heparin pro Milliliter Blut hinzugefügt wurden, um eine Gerinnung zu verhindern.

Die Blutabnahme erfolgte am Vorabend bzw. kurz vor der Verarbeitung der Proben, um eine gute Qualität der darin enthaltenen Zellen zu sichern.

### 2.3.2 PBMC-Isolierung

Mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) von den anderen Blutbestandteilen getrennt. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen 30 ml heparinisiertes Vollblut in einem Blaukopfröhrchen (50 ml) mit 5 ml Hanks Salzlösung (HBSS) vermischt und anschließend in einem weiteren Blaukopfröhrchen auf eine Schicht mit 15 ml Ficoll-Hypaque mit der Dichte 1,007 g/ml geschichtet.

Daraufhin wurde die Probe 30 Minuten bei 740 g (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert.

Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlohydrin, das sich leicht in Wasser löst. Seine spezifische Dichte ist mit  $1,077 \text{ g/cm}^3$  höher als die von Lymphozyten, jedoch geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten, sodass nach der Zentrifugation sich vier Zonen ausbilden. Da die Erythrozyten und die Granulozyten dichter als Ficoll sind, sedimentierten sie auf dem Boden des Röhrchens unter der Ficoll-Schicht, während Lymphozyten und einige Makrophagen sich in der Zwischenschicht

zwischen Ficoll und der obersten Schicht, bestehend aus restlichem Blutplasma, Medium und kleinsten Partikeln wie Thrombozyten, sammeln (siehe Abbildung 8).

Nun wurde das Plasma abgenommen und als Supplement für die Zellkulturen aufbewahrt. Folgend wurden die PBMC in ein Blaukopfröhrchen gegeben und mit HBSS auf 50 ml angereichert. Dieses Gemisch wurde 10 Minuten bei 370 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment aus zwei Röhrchen zusammengegeben, um dann mit HBSS auf 25 ml aufgefüllt zu werden. Erneut erfolgte der vorhergehende Waschgang. Das Sediment wurde mit RPMA 1640 Medium (1 ml RPMI je 10 ml Blut) aufgesäht. Die Zellen konnten darauf innerhalb von zwei Stunden ausgezählt werden.

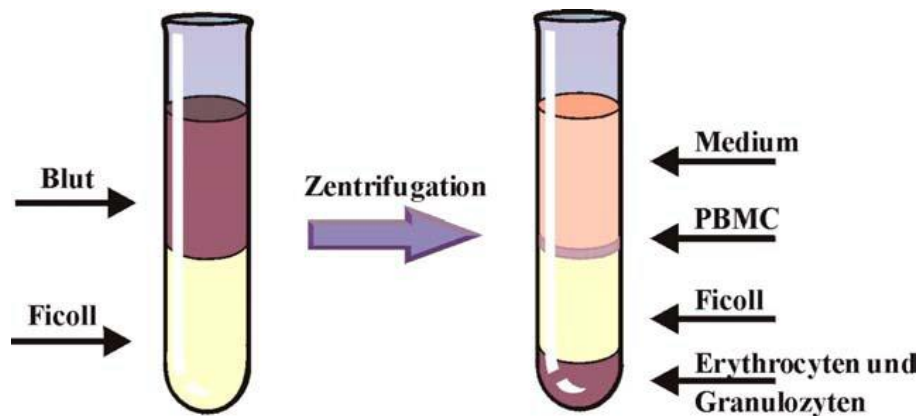


Abbildung 8: PBMC-Isolierung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

(Quelle: Eigene Darstellung)

### 2.3.3 Zellzahlbestimmung

Nachdem 20  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 180  $\mu\text{l}$  Acridin-Orange vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert wurden, konnten die Lymphozyten mittels Fluoreszenzmikroskop bei 16-facher Vergrößerung auf vier Quadraten mit grober Rasterung à 16 Feldern (= 1  $\text{mm}^2$ ) ausgezählt werden. Das Volumen (0,1  $\text{mm}^3$ ) berechnet sich aus der Kammertiefe (0,1 mm), der Fläche der Kleinquadrate (0,0625  $\text{mm}^2$ ) und der Anzahl der Kleinquadrate (16). Da aber die Konzentration in Zellzahl/ ml angegeben wird, muss noch ein

Multiplikationsfaktor von  $10^4$  berücksichtigt werden. Für die Berechnung gilt dementsprechend folgende Formel:

Zellzahl/ ml = Zellzahl in einem Kleinquadrat  $\times 16 \times 10^4 \times$  Verdünnungsfaktor

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Zellzahl auf 1 Million Zellen pro Milliliter RPMI 1640 Medium vermengt.

### **2.3.4 Medikamentenkonzentrationen**

Die Verdünnungen der beiden Medikamente Amantadin<sup>®</sup> und Rebetol<sup>®</sup> wurden mit RPMI 1640 Medium angesetzt.

Die Konzentrationen variierten im Verlauf der Versuchsreihe und reichten von maximal 50  $\mu\text{g/ml}$  bis minimal 0,0005  $\mu\text{g/ml}$ . Es wurden pro Proband vier bis fünf Verdünnungen im Abstand von je einer Zehnerpotenz angesetzt.

### **2.3.5 Zellkulturen zur Bestimmung der Antigen-induzierten Lymphozyten-Proliferation**

Um die PBMC-Proliferation zu bestimmen wurden sie auf 96-well Mikrotiterplatten übertragen. Ihr Wachstum wurde hierbei durch spezifische Antigene (BCG, TT, PPD) und Mitogene angeregt.

In jedes well der Mikrotiterplatten wurden 150  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen) sowie 50  $\mu\text{l}$  Antigen bzw. Antigen plus Medikamente, RPMI 1640 Medium als Spontanwert und Pokeweed Mitogen (PWM) als Proliferationskontrolle pipettiert.

Es wurden insgesamt vier Platten beimpft. Jede Platte enthielt acht Wells der Positiv- (PWM) und drei Wells der Negativkontrolle (RPMI). Auf die erste Platte wurden in jeweils vier Wells die Antigene sowie die verschiedenen Verdünnungen der Medikamente gegeben, auf die weiteren Platten jeweils ein Antigen zusammen mit den Verdünnungen der Medikamente.

Diese Proben wurden für sieben Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  in wasserdampfgesättigter Atmosphäre belassen.

Eine Durchstechflasche BCG-medac enthält mindestens  $2 \times 10^8$  und nicht mehr als  $3 \times 10^9$  lebensfähige Einheiten von BCG Bakterien. Diese wurde mit 10 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Eine 1:8 Verdünnung der BGC-Suspension mit RPMI ergab die Konzentration BGC1000, die noch einmal 1:10 mit RPMI verdünnt wurde und somit die verwendete Konzentration BCG100 ergab.

Eine Ampulle Tetanol<sup>®</sup> á 0,5 ml enthält 40 I.E. und wurde für die weiteren Versuche 1:10 mit RPMI verdünnt.

Eine Ampulle TuberkulinGT1000 wurde in 5 ml RPMI gelöst und somit die Verdünnung PPD 50 erhalten.

Eine Flasche PWM enthält 0,4 mg Protein und wurde in 10 ml RPMI gelöst. Somit wurde es als Positivkontrolle in der Verdünnung 1:40 eingesetzt.

Jeweils dieselbe Menge RPMI 1640 Medium diente als Negativkontrolle.

### **2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Auf die im Inkubator befindlichen 96-well-Mikrotiterplatten (siehe 2.3.5) wurden ca. 16 Stunden vor Ablauf der Kultivierungszeit <sup>3</sup>H-Thymidin (0,74 MBq/ml, 20 µl/well) pipettiert. Nach den sieben Inkubationstagen wurden die markierten Zellen mithilfe des SKATRON Combi Cell Harvester auf Filtermatten gegeben. Diese Matten wurden für mindestens drei Stunden getrocknet und folgend mit Szintillationsgel (ULTIMA Gold) in Plastikfolie eingeschweißt, um dann die von den Zellen emittierte  $\beta$ -Strahlung in einem  $\beta$ -Szintillationszähler (LKB-Wallc) zu messen. Die proliferative Aktivität konnte anhand der Zählrate (cpm = counts per minute) ermittelt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der von den unterschiedlichen Probanden erhaltenen Spontanproliferationswerte, wurde der SI als Quotient der cpm in Proben mit Antigenen und der cpm in Proben ohne Antigen berechnet.



### **2.3.7 Zellkulturen für die Durchflusszytometrie und den enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA)**

In 24-well-Platten wurden 1200 µl Zellsuspension und 400 µl Antigen bzw. Antigen plus Ribavirin/ Amantadin sowie RPMI als Leerwert und PWM zur Stimulationskontrolle gegeben und sieben Tage im Brutkasten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre belassen.

Am darauffolgenden Tag wurde der komplette Inhalt jedes Wells für die Durchflusszytometrie in Rundbodenröhrchen gegeben.

Für den ELISA wurden die Überstände der Zellkulturen am siebten Tag abpipettiert und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C in Reaktionsgefäße (1,5 ml) aufbewahrt.

### **2.3.8 Durchflusszytometrie**

Nachdem die Zellen in die Rundbodenröhrchen gegeben, bei 370 g für ca. fünf Minuten abzentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde, wurden 1000 µl Waschpuffer hinzugegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 370 g, der Überstand wurde abpipettiert und 500 µl Waschpuffer zugegeben. Diese Zellsuspension wurde auf mit dem jeweiligen Antikörper (5 bis 10 µl) bestückten Rundbodenröhrchen einheitlich appliziert. Auf das erste Röhrchen wurden die drei Isotypkontrollen, auf die anderen vier Röhrchen jeweils eine der oben genannten Antikörper-Kombinationen gegeben. So enthielt jedes Röhrchen ca. 160.000 Zellen.

Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Reaktion mit 1000 µl Waschpuffer abgestoppt. Es folgten weitere zwei Waschschriffe mit der Zentrifuge. Hiernach wurden zu den antikörpermarkierten Zellen 150 µl Waschpuffer und 50 µl Fixierlösung gegeben.

Bei der Messung mit dem FACSCalibur™ wurden 10.000 Zellen je Röhrchen gezählt.

### 2.3.9 Zytokin-ELISA

Zunächst wurden gereinigte unmarkierte monoklonale Maus oder polyklonale Ratte anti-human Zytokin Antikörper in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) vermengt (siehe Tabelle 15), dann je 100 µl der Verdünnungen in die 96-well-Mikrotiterplatten übertragen und bei 4 °C über Nacht belassen. Am Folgetag erfolgte morgens eine dreimalige Waschung der Platten mit Waschpuffer. Anschließend wurden diese für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. 75 µl der aufgetauten Überstände wurden hiernach auf die Platten übertragen und für zwei Stunden bei 37 °C in einem befeuchteten Brutschrank gegeben. Zudem wurde auf jeder Platte eine Zytokin-Standardverdünnungsreihe (siehe Tabelle 16) mit acht Verdünnungsstufen á 100 µl mitgeführt. Die inkubierten Platten wurden erneut drei Mal mit Waschpuffer gereinigt, um überschüssige Anteile zu entfernen; darauf wurden 100 µl einer Suspension mit zuvor verdünntem, biotinyliertem Antikörper zugefügt (siehe Tabelle 17).

Dieses Gemisch wurde 90 Minuten bei 37 °C im befeuchteten Brutschrank inkubiert. Es erfolgte ein abermaliger Waschgang der Platten, auf welche dann 25 µl Avidin-gekoppelte Peroxidase (2,5 µg/ml Waschpuffer) pipettiert wurden. Anschließend wurden die Platten für 40 Minuten bei Raumtemperatur bebrütet. Nach dreimaligem Waschvorgang wurde in jedes Nöpfchen 150 µl Substratlösung (0,5 mg O-Phenyldiamin/ml Citratpuffer) gegeben und die durch Sauerstoffabspaltung aus Wasserstoffperoxid entstandene braunrote Farbreaktion mit 25-%iger Schwefelsäure gestoppt.

Die quantitative Auswertung der Zytokine fand mittels Extinktionsmessungen bei 450 nm im ELISA-Reader statt und wurde in pg/ml angegeben. Mithilfe des Programmes Easyfit wurde für jedes Zytokin ein Konzentrationsgrenzwert bestimmt, oberhalb dessen das Ergebnis als positiv galt (siehe Tabelle 18). Hierzu wurden die Ergebnisse mit der jeweils errechneten Standardkurve verglichen.

Antikörper (capture AB)	Konzentration [ $\mu\text{l}/ 10 \text{ ml}$ ]
Mouse Anti-Human IL-1 $\alpha$	10
Rat Anti-Human IL-5	30
Rat Anti-Human IL-6	30
Rat Anti-Human IL-10	30
Rat Anti-Human IL-13	30
Rat Anti-Human GM-CSF	30
Mouse Anti-Human IFN- $\gamma$	30
Mouse Anti-Human TNF- $\alpha$	60
Mouse Anti-Human TNF- $\beta$	30

Tabelle 15: Konzentrationen der gereinigten monoklonalen anti-human Zytokin Antikörper

Zytokin	Ausgangsstandardkonzentration [ $\mu\text{l}/ 10 \text{ ml}$ ]
IL-1 $\alpha$	12,5
IL-5	20
IL-6	20
IL-10	20
IL-13	20
GM-CSF	20
IFN- $\gamma$	20
TNF- $\alpha$	20
TNF- $\beta$	20

Tabelle 16: Konzentrationen der rekombinanten human Zytokin Standards

Antikörper (detection AB)	Konzentration
Mouse Anti-Human IL-1 $\alpha$	8 $\mu\text{l}$ in 5 ml WP
Rat Anti-Human IL-5	12 $\mu\text{l}$ in 4 ml WP
Rat Anti-Human IL-6	8 $\mu\text{l}$ in 10 ml WP
Rat Anti-Human IL-10	10 $\mu\text{l}$ in 10 ml WP
Rat Anti-Human IL-13	5 $\mu\text{l}$ in 2,5 ml WP
Rat Anti-Human GM-CSF	5 $\mu\text{l}$ in 5 ml WP
Mouse Anti-Human IFN- $\gamma$	5 $\mu\text{l}$ in 3,1 ml WP
Mouse Anti-Human TNF- $\alpha$	5 $\mu\text{l}$ in 5 ml WP
Mouse Anti-Human TNF- $\beta$	5 $\mu\text{l}$ in 5 ml WP

Tabelle 17: Konzentrationen der biotinylierten monoklonalen anti-human Zytokin Antikörper

Zytokin	Grenzwert [ $\text{pg}/ \text{ml}$ ]	Maximalwert [ $\text{pg}/ \text{ml}$ ]
IL-1 $\alpha$	125	8000
IL-5	234	15000
IL-6	125	8000
IL-10	78	5000
IL-13	156	10000
GM-CSF	156	10000
IFN- $\gamma$	625	40000
TNF- $\alpha$	156	10000
TNF- $\beta$	156	10000

Tabelle 18: Definierte Zytokingrenzwerte in pg/ml

## **2.4 Statistik**

Die experimentell gewonnenen Daten wurden in Computertabellen eingepflegt und mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS Statistics weiterverarbeitet. In Schaubildern wurden so der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung aus den 20 Probandenwerten für jede Konzentration und jede Testvariante (Proliferation, Aktivität und Zytokinproduktion) dargestellt. Zudem wurde mit dem Wilcoxon-Testverfahren die Signifikanz bestimmt. Werte von  $p < 0,05$  galten hierbei als signifikant. Zur einfacheren Orientierung wurden in den Diagrammen p-Werte  $< 0,05$  mit \*, Werte  $< 0,01$  mit \*\* und Werte  $< 0,001$  mit \*\*\* markiert.

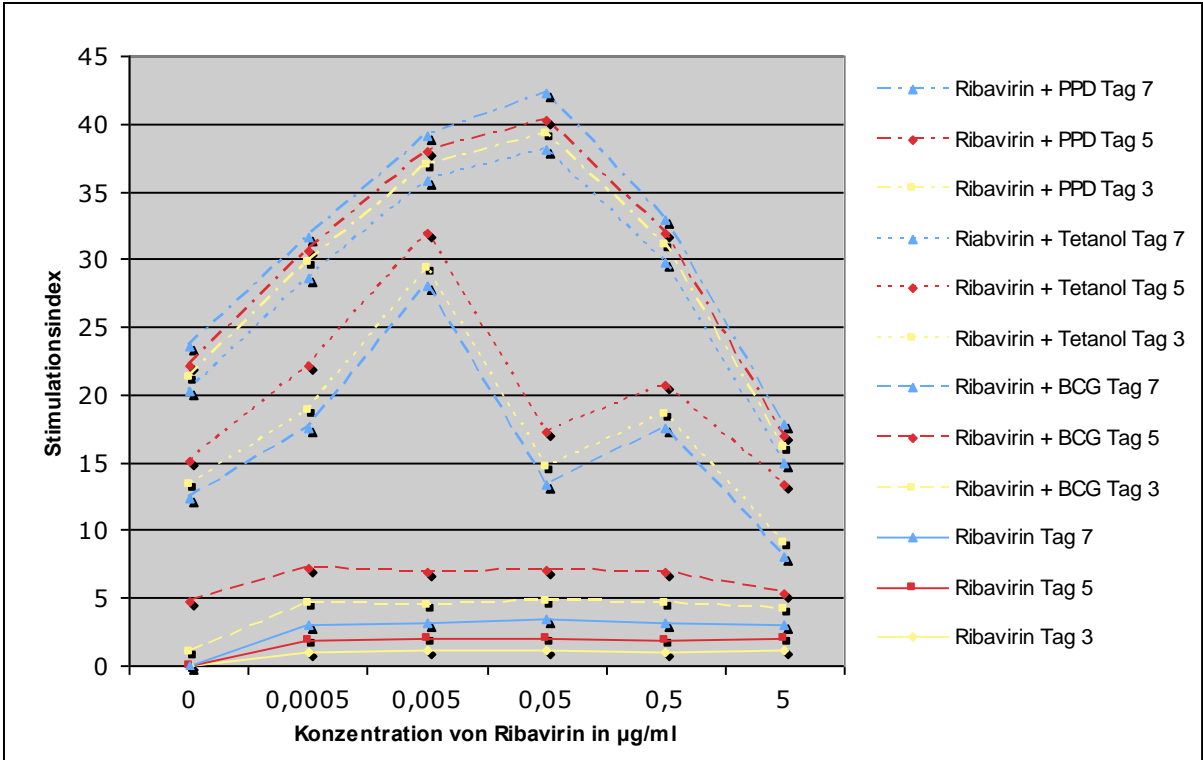
## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Proliferationsassay**

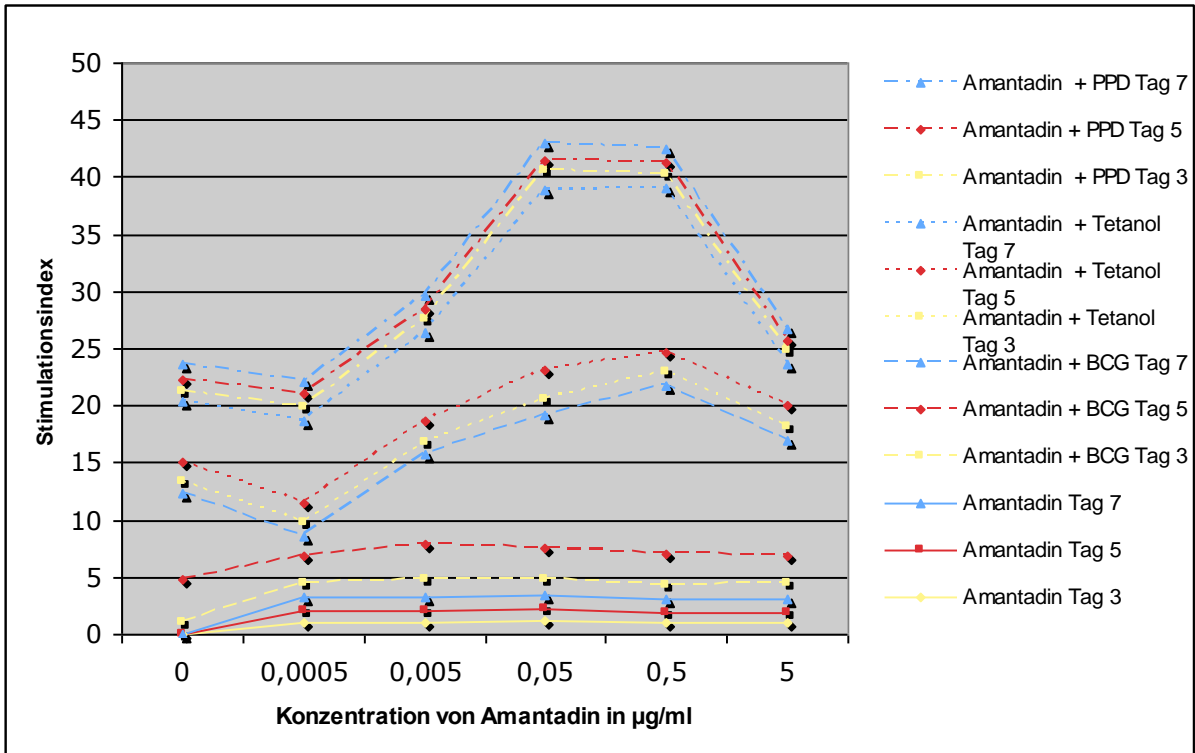
#### **3.1.1 Kinetik der Zellproliferation**

In einem ersten Schritt wurden die optimalen Inkubationszeiten der PBMC mit den Wirkstoffen Ribavirin bzw. Amantadin und den spezifischen Antigenen (BCG, Tetanol, PPD) ermittelt. Hierzu wurden die Zellen drei, fünf bzw. sieben Tage inkubiert und danach die mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten Zellen ausgezählt.

In den folgenden beiden Abbildungen (siehe Abbildungen 9 und 10) ist zu erkennen, dass die proliferative Reaktion der PBMC bei Ribavirin und Amantadin sowohl ohne Kostimulation als auch bei Kostimulation durch BCG, Tetanol und PPD bis zum siebten Tag deutlich zunimmt. Deswegen wurden in den weiteren Versuchsreihen die Zellen für den Proliferationsassay für jeweils sieben Tage inkubiert, um eine optimale Proliferation zu ermöglichen. Bei diesem Probanden ist zu erkennen, dass die höchsten Konzentrationen sowohl bei Ribavirin als auch bei Amantadin bei Kostimulation durch PPD erreicht werden, gefolgt von Tetanol und schließlich BCG.



**Abbildung 9: Proliferative Wirkung von Ribavirin auf PBMC an den Tagen 3, 5 und 7**  
 Vergleich der proliferativen Reaktion der PBMC eines gesunden Probanden mit und ohne Kostimulation von Ribavirin durch BCG, Tetanol und PPD an den Tagen 3, 5 und 7.

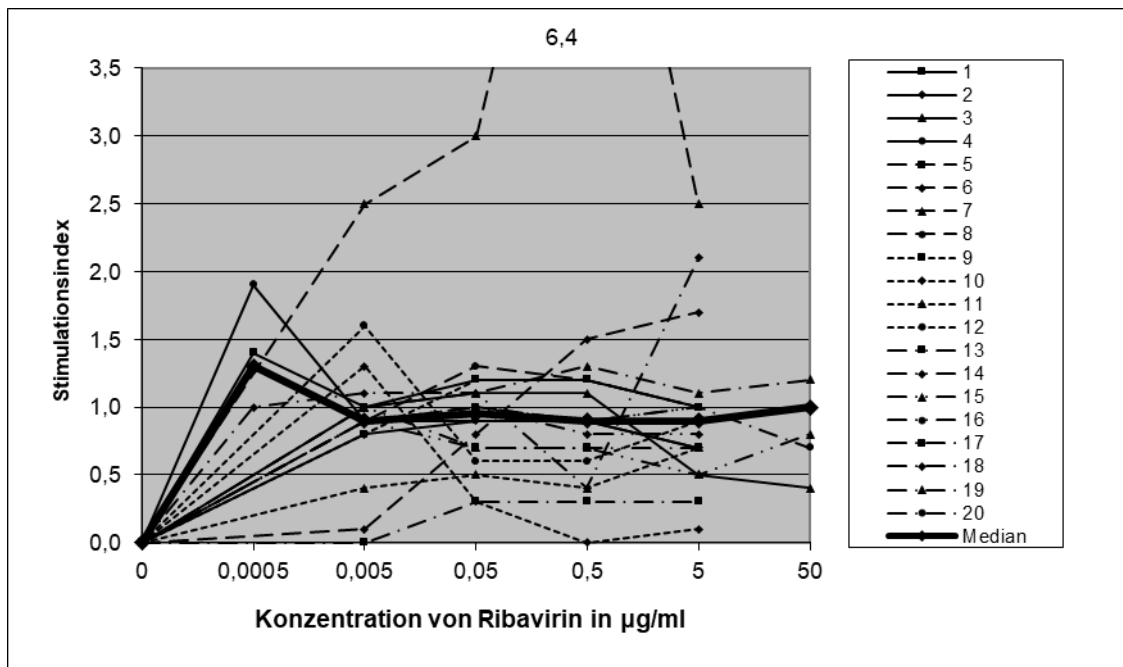


**Abbildung 10: Proliferative Wirkung von Amantadin auf PBMC an den Tagen 3, 5 und 7**  
 Vergleich der proliferativen Reaktion der PBMC eines gesunden Probanden mit und ohne Kostimulation von Amantadin durch BCG, Tetanol und PPD an den Tagen 3, 5 und 7.

### 3.1.2 Reaktion der PBMC auf Ribavirin ohne Kostimulation

Im Folgenden wurden die PBMC der 20 gesunden Probanden mit Ribavirin ohne Zusatz eines Kostimulans für sieben Tage inkubiert, mit <sup>3</sup>H-Thymidin markiert und anschließend der SI-Index ermittelt.

Bei einem Probanden (Proband 7) kam es zu einer eindeutig positiven Reaktion der PBMC. Die PBMC eines weiteren Probanden (Proband 18) zeigten in höherer Konzentration von Ribavirin eine leicht positive Reaktion. Unter diesen beiden Probanden war ein Pollen- und Zitrusfruchtallergiker, bei keinem war eine vorherige Einnahme von Ribavirin oder eine Allergie dagegen bekannt. Wir gehen davon aus, dass die nachgewiesene Proliferationszunahme der PBMC nicht durch individuell vorhandene spezifische Gedächtniszellen hervorgerufen wurde, denn auch in der Allergiediagnostik gilt eine positive Reaktion im LTT nur als verdächtig für eine Allergie und das Ergebnis muss im klinischen Zusammenhang bewertet werden<sup>125</sup>. Die meisten Probanden wiesen SI-Werte unter zwei auf. Die Mediankurve stieg bis zur Konzentration 0,5 µg/ml an und nahm danach wieder ab (siehe Abbildung 11).

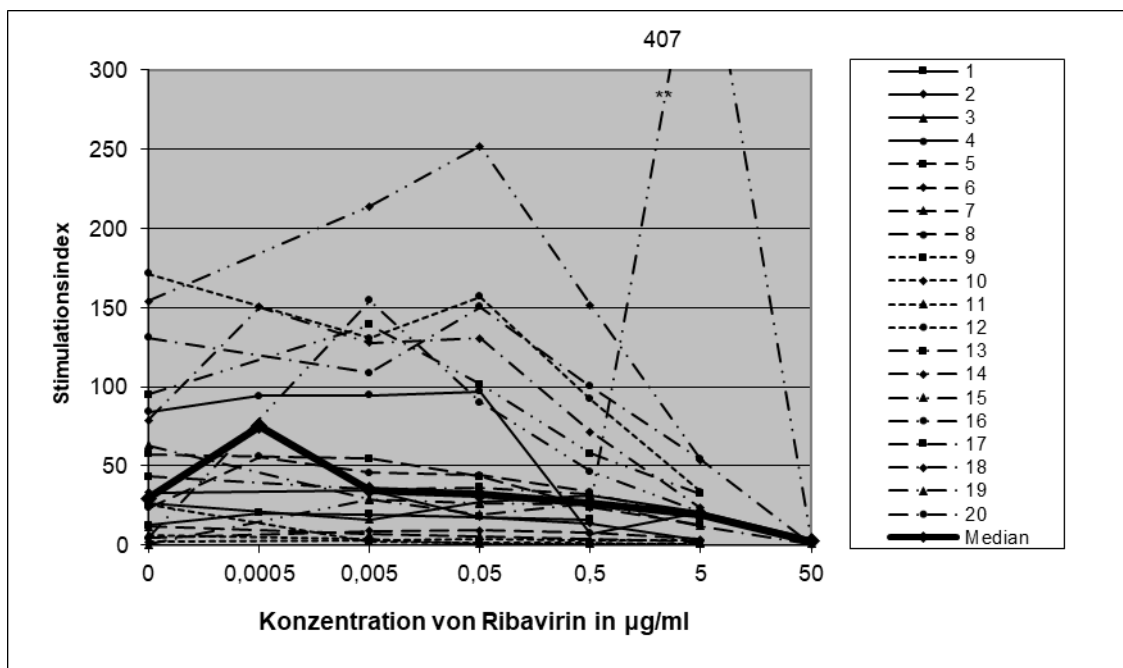


**Abbildung 11: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Ribavirin bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.3 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit BCG

Nach siebentägiger Inkubation der PBMC mit BCG alleine wurden Stimulationsindices zwischen 0,4 und 171,3 bei den PBMC der zwanzig Probanden erreicht. Bei Zugabe von BCG und Ribavirin zu den PBMC kam es bei der 5 µg/ml Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation. Bei den PBMC kam es bis auf zwei Probanden (14, 15) zu keinen starken Veränderungen der SI-Werte gegenüber dem Ausgangswert, wobei die meisten Werte als positive Testreaktion zu werten waren. Die Mediankurve hatte ihr Maximum bei der kleinsten Konzentrationsstufe und nahm von da an kontinuierlich ab (siehe Abbildung 12).



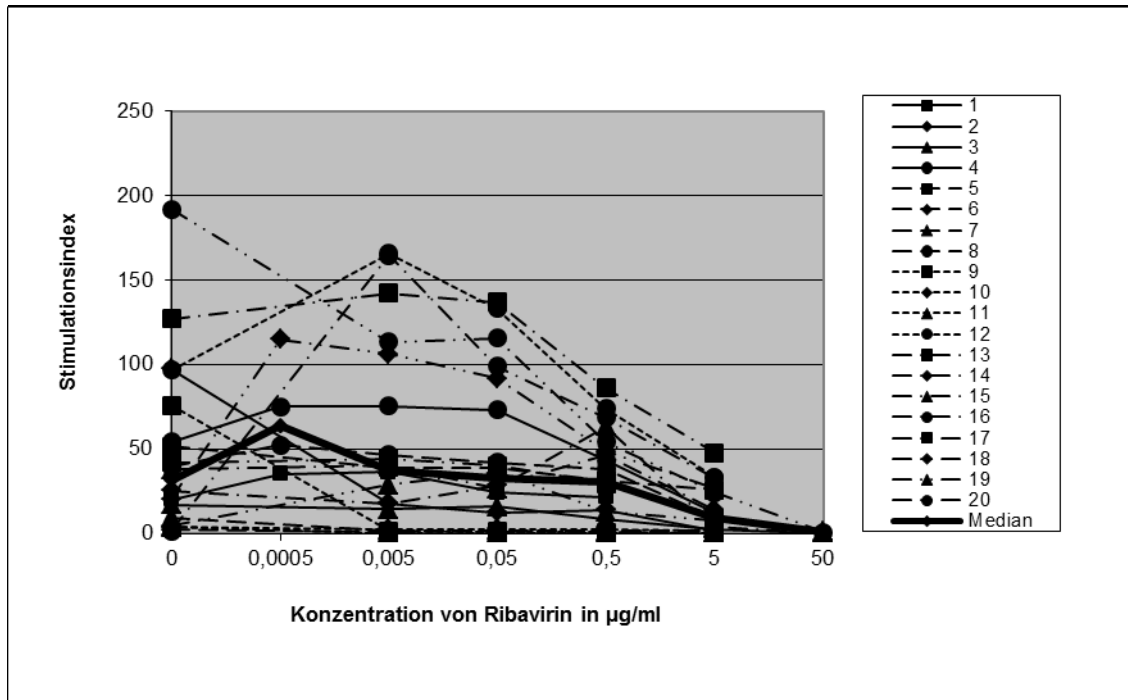
**Abbildung 12: Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit BCG bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

### 3.1.4 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol

Die Stimulationsindices durch Tetanol alleine nahmen Werte zwischen 1,4 und 191,9 an. Wieder kam es nach Zugabe von Ribavirin unter Kostimulation mit Tetanol bei einer Konzentration von 5 µg/ml zu einer signifikanten Suppression

der Proliferation. Bis auf drei Probanden (6, 9, 11) erreichten alle anderen positive SI-Werte nach Zugabe von Ribavirin. Betrachtet man die Mediane, so fällt auf, dass sie mit zunehmender Konzentration abnahmen (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol**

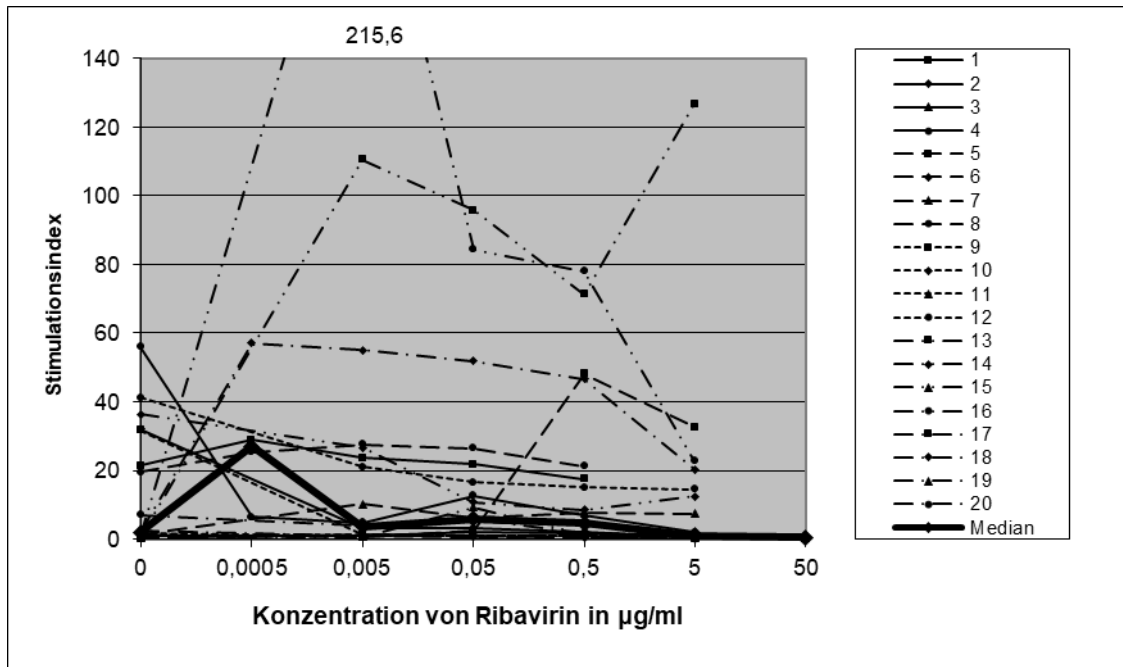
Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.5 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit PPD

Durch alleinige Stimulierung der PBMC mit PPD wurden SI-Werte zwischen 0,4 und 55,9 erreicht. Die PBMC wiesen bei der Hälfte der Probanden SI-Werte über zwei auf, davon waren acht Reaktionen als eindeutig positiv zu werten (siehe Abbildung 14). PPD wirkt spezifisch auf TH<sub>1</sub>-Zellen und es ist bekannt, dass es TH<sub>1</sub>-Responder und TH<sub>1</sub>-Nonresponder gibt. Bei zwei der eindeutigen TH<sub>1</sub>-Responder kam es nach Zugabe von Ribavirin zu einer Abnahme der Proliferation. Des Weiteren zeigte sich bei vier der „Non-Responder“ nach Ribavirinzugabe eine deutliche Zunahme der SI-Werte. So wurden teilweise Werte über 100 erreicht. Auch bei der Stimulation durch PPD nahmen die



Medianwerte wie bei der Stimulation durch Tetanol in den höheren Konzentrationen ab.

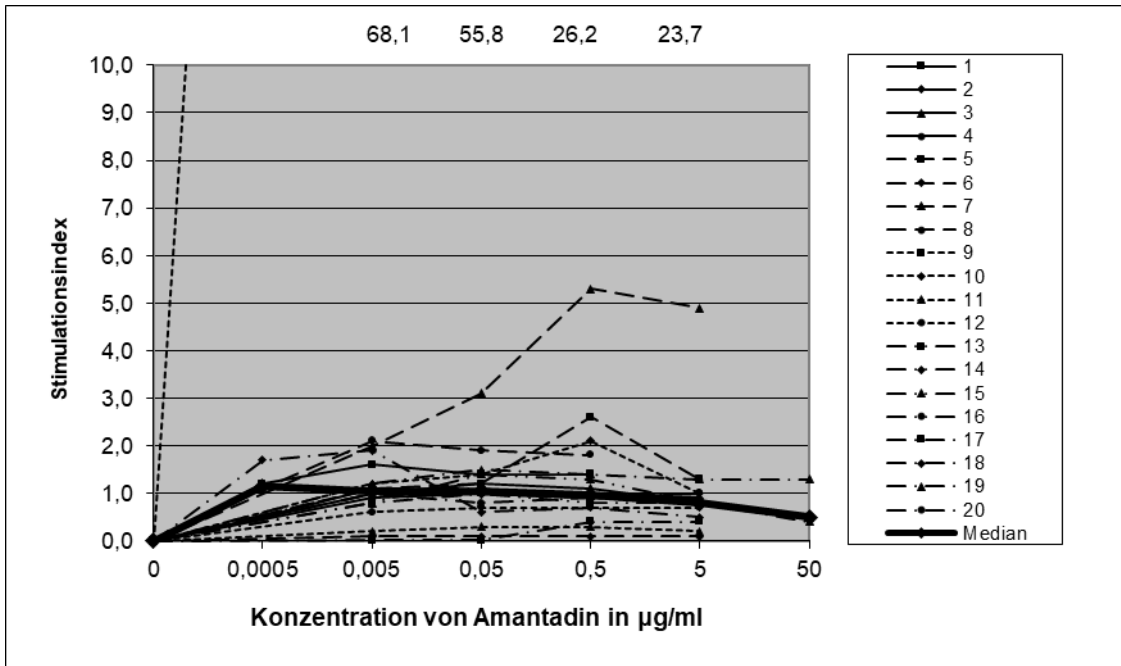


**Abbildung 14: Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit PPD bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.6 Reaktion der PBMC auf Amantadin ohne Kostimulation

Der Wirkstoff Amantadin bewirkte nach sieben Tagen Inkubation bei den PBMC von fünf Probanden eine positive Reaktion, wovon die meisten Stimulationsindices Werte zwischen zwei und drei annahmen. Einzig bei Proband neun wurde von den PBMC SI-Werte um die 60 erreicht. Die PBMC der restlichen 15 Probanden zeigten keine positive Reaktion auf Amantadin. Die Mediankurve nahm mit zunehmender Konzentration von Amantadin ab. Auffallend war der parallele Kurvenverlauf bei der Mehrzahl der Probanden mit einem Maximum bei 0,05 µg/ml Amantadin (siehe Abbildung 15).

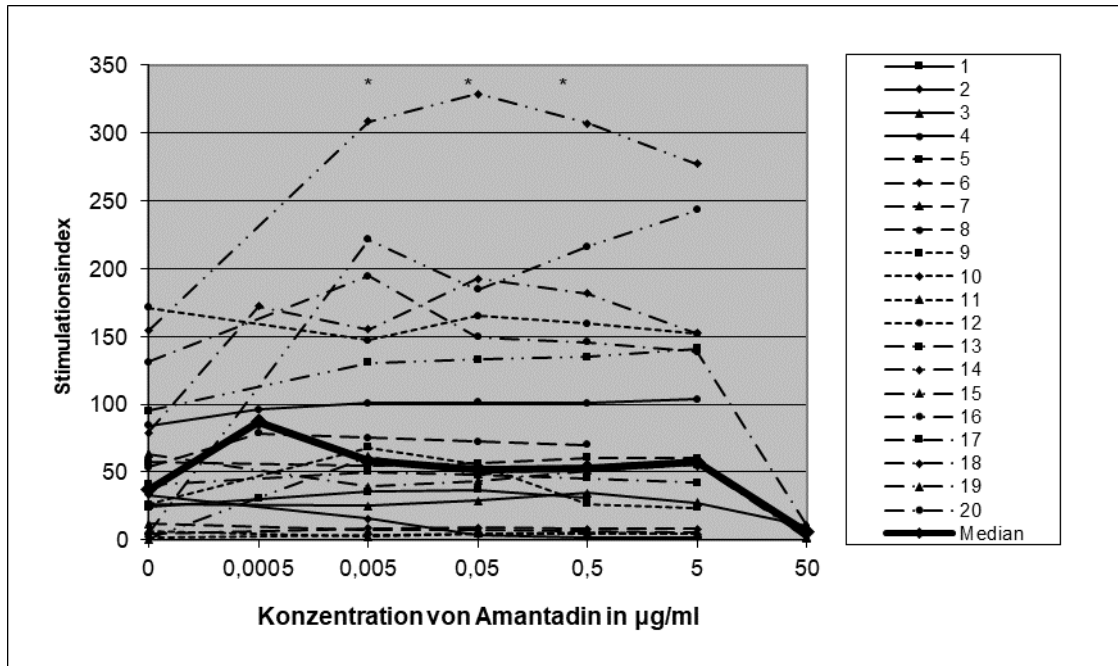


**Abbildung 15: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Amantadin bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.7 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit BCG

Die alleinige Stimulierung der Zellen mit BCG führte zu SI-Werten zwischen 0,4 und 171,3. Im Verdünnungsbereich zwischen 0,005 und 0,5 µg/ml kam es bei Zugabe von Amantadin zu einer signifikanten Stimulierung der PBMC, welche bei jedem Probanden in fast allen Verdünnungen eindeutig positiv reagierte. Die Mediankurve verlief schwach abfallend (siehe Abbildung 16).

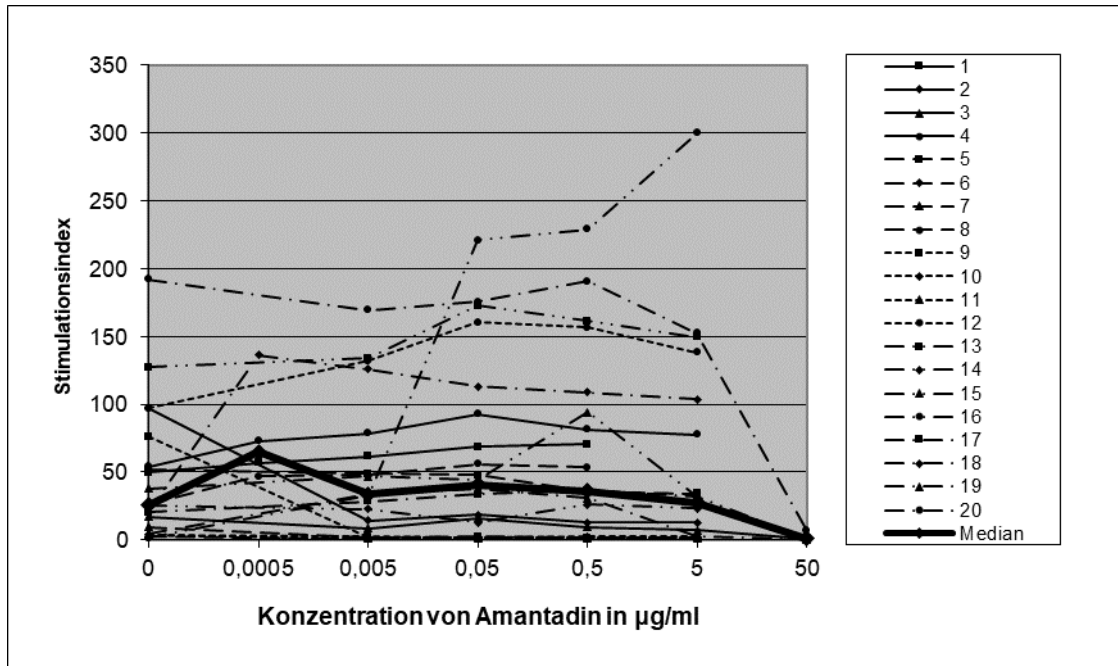


**Abbildung 16: Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit BCG bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

### 3.1.8 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol

Die alleinige Stimulation durch das Antigen Tetanol führte zu SI-Werten zwischen 1,4 und 191,9, wovon eine Reaktion negativ ausfiel. Nach Zugabe von Amantadin reagierten die PBMC bei 17 der 20 Probanden mit deutlich positiven Testreaktionen. Im Vergleich zur alleinigen Stimulierung mit Tetanol kam es zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme der Proliferation. Wieder konnte bei den Medianwerten eine Abnahme der SI-Werte ausgehend von der kleinsten Konzentration beobachtet werden, wobei in den hohen Konzentrationsstufen die PBMC bei der Mehrzahl der Probanden eine positive Reaktion aufwiesen (siehe Abbildung 17).

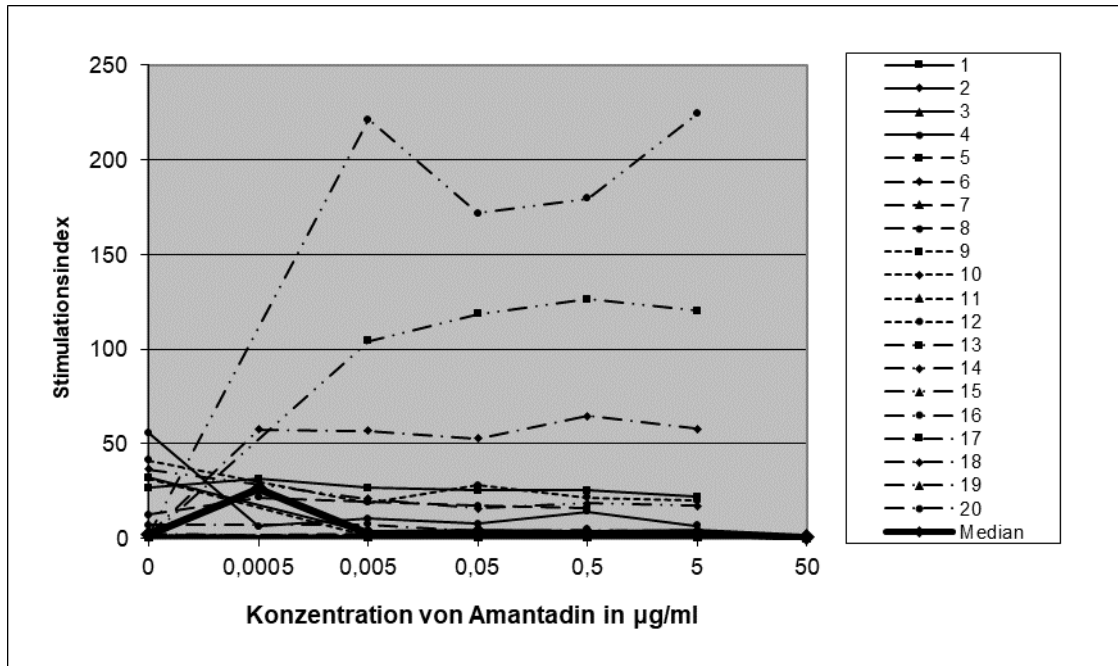


**Abbildung 17: Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.9 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit PPD

Durch alleinige Stimulierung der Zellen mit PPD wurden SI-Werte zwischen 0,1 und 55,9 erreicht. Die PBMC von zehn Probanden reagiert nicht auf die Stimulierung, bei zwei reagierten sie schwach positiv und bei acht reagierten sie deutlich positiv. In den Lymphozytenüberständen kam es bei fünf Probanden auch nach Zugabe von Amantadin zu einer negativen Testreaktion bei Stimulierung mit PPD. Bei sechs der Probanden, deren PBMC negativ auf die alleinige Stimulierung durch PPD reagierten, kam es nach Zugabe von Amantadin zu positiven Testreaktionen, die teilweise ein Vielfaches des Ausgangswertes erreichten. Bei den PBMC eines Probanden, dessen PBMC positiv auf alleinige Stimulierung durch PPD reagierte, bewirkte die Zugabe von Amantadin keine weiteren positiven Reaktionen, bei einigen anderen kam es zu einer Abnahme der SI-Werte im Vergleich zum Ausgangswert. Abermals folgte die Kurve der Medianwerte dem Verlauf der vorherigen Kurven, nämlich nahezu kontinuierlich abnehmend (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der proliferativen Reaktion von PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit PPD bei 20 gesunden Probanden. Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse des Proliferationsassays

Die alleinige Stimulierung der PBMC mit Ribavirin und Amantadin bewirkte bei den meisten Probanden keine positive Reaktion.

Das Antigen BCG erzielte bereits ohne Kostimulation mit Ribavirin höhere Stimulationsindices (in dieser Arbeit im Durchschnitt einen SI-Wert von 51,5 bei Werten zwischen 0,4 und 171,3) und mit den Lymphozyten der meisten Probanden kam es zu einer positiven Testreaktion. Die Zugabe von Ribavirin bewirkte keine wesentliche Zunahme der Messwerte, sondern wirkte in zunehmender Konzentration bei fast allen Probanden inhibitorisch auf die PBMC und führte bei der 5 µg/ml Konzentration von Ribavirin zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation.

Nach Zugabe von Amantadin zu mit BCG stimulierten Zellen kam es hingegen im Verdünnungsbereich zwischen 0,005 und 0,5 µg/ml zu einer signifikanten Stimulierung der PBMC.

Der Stimulus Tetanol erzielte ähnlich wie BCG im Durchschnitt SI-Werte von 46,0 (Werte zwischen 1,4 bis 191,9) und wieder reagierten die PBMC fast aller Probanden positiv. Auch die Zugabe von Tetanol zu der 5 µg/ml Konzentration

von Ribavirin führte zu einer signifikanten Suppression der Lymphozytenproliferation und Ribavirin wirkte in höheren Konzentrationen inhibierend auf das Proliferationsverhalten der PBMC. Durch die Zugabe von Amantadin zu mit Tetanol stimulierten Zellen kam es zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme der Proliferation.

Die schwächste immunmodulierende Wirkung zeigte PPD mit durchschnittlichen SI-Werten von 13,0 (Werte zwischen 0,4 und 55,9). Die PBMC von nur noch ungefähr der Hälfte der Probanden reagierten positiv. Bei Zugabe von Ribavirin und Amantadin kam es zu keinen eindeutigen weiteren Veränderungen des Proliferationsverhaltens der PBMC.

Bei allen Mediankurven von Ribavirin bzw. Amantadin mit den Antigenen BCG, Tetanol und PPD war der Verlauf ähnlich, nämlich mehr oder weniger kontinuierlich abnehmend mit zunehmender Konzentration von Ribavirin bzw. Amantadin.

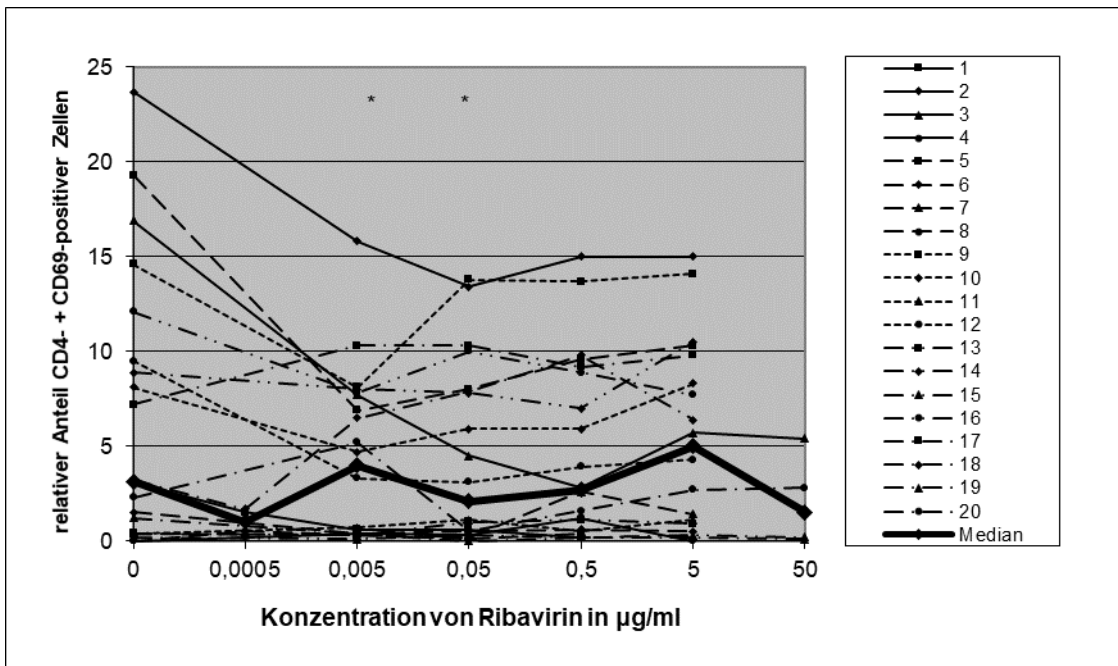
### **3.2 Durchflusszytometrie**

Mithilfe der Durchflusszytometrie können die Art, der prozentuale Anteil an unterschiedlichen Zellpopulationen und der Anteil an aktivierten Zellen bestimmt werden. In dieser Versuchsreihe wurden am siebten Tag die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD19 und CD56 herausgesucht und deren Aktivierung mittels CD69-Ausbildung festgestellt. Doppelmarkierte Zellen stellten demzufolge aktivierte Zellen dar.

#### **3.2.1 Reaktion der PBMC auf Ribavirin ohne Kostimulation**

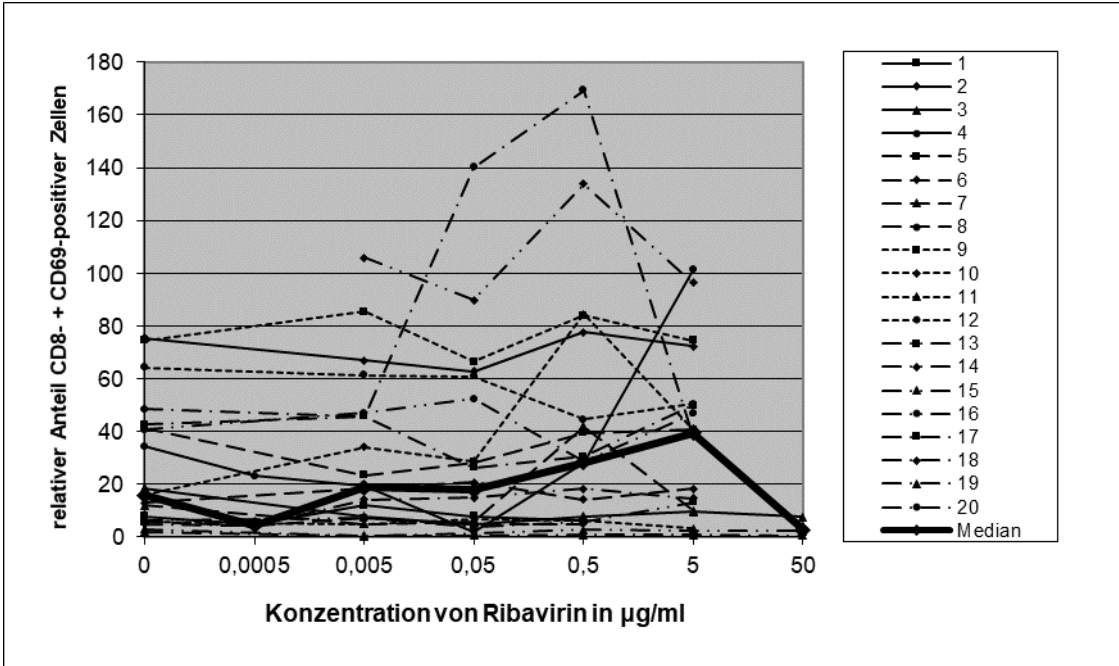
Bei der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass Ribavirin ohne Kostimulans eine signifikante Aktivierung der CD4-positiven Zellen im mittleren Verdünnungsbereich (0,005, 0,05 µg/ml) bewirkte (siehe Abbildung 19). Des Weiteren fand eine verstärkte Expression von CD69 durch CD19-positiv Zellen im mittleren Verdünnungsbereich statt (0,05 µg/ml) (siehe Abbildung 21). Bei den meisten Probanden kam es bei den CD4-, CD8-, CD19- und CD56-positiven Zellen zu einer ansteigenden Kurve ausgehend von der niedrigsten

Konzentrationsstufe, deren Maximum sich bei den CD4-, CD8- und CD56-positiven Zellen bei der 0,5- bzw. 5 µg/ml Konzentration von Ribavirin befand (siehe Abbildungen 19 bis 22). Das Maximum der Mediankurve der CD19-positiven Zellen befand sich bei der 0,5 µg/ml Konzentration (siehe Abbildung 21). Betrachtet man die durchschnittlichen Messwerte, so stellt man fest, dass die CD4-positiven Zellen am geringsten und die CD8-positiven Zellen am stärksten aktiviert wurden.



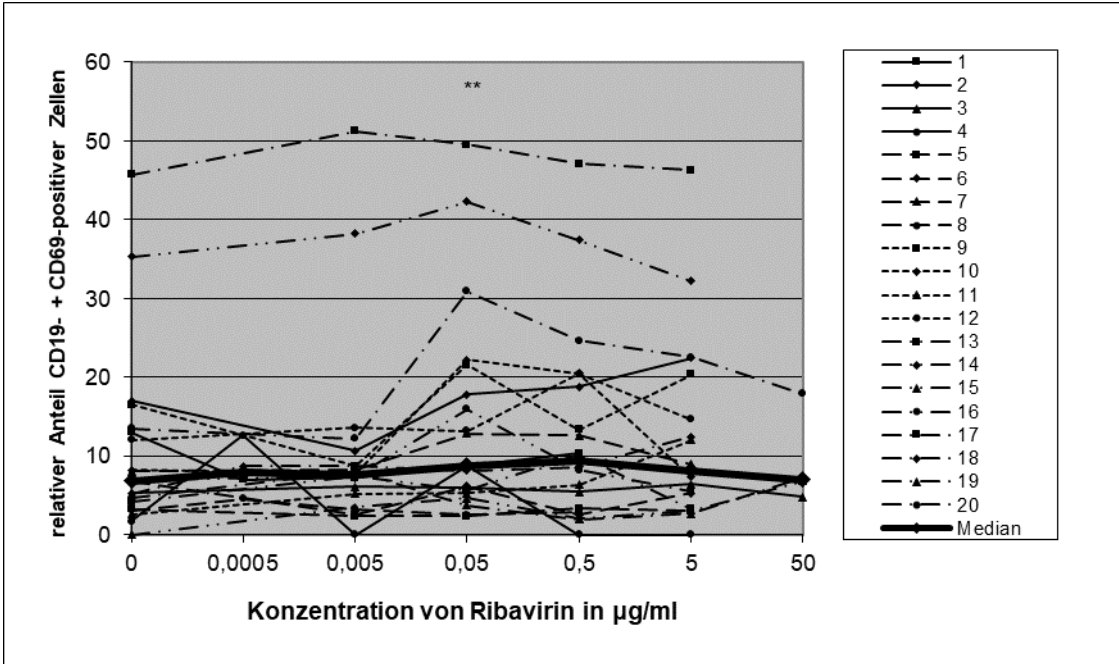
**Abbildung 19: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 20: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen**

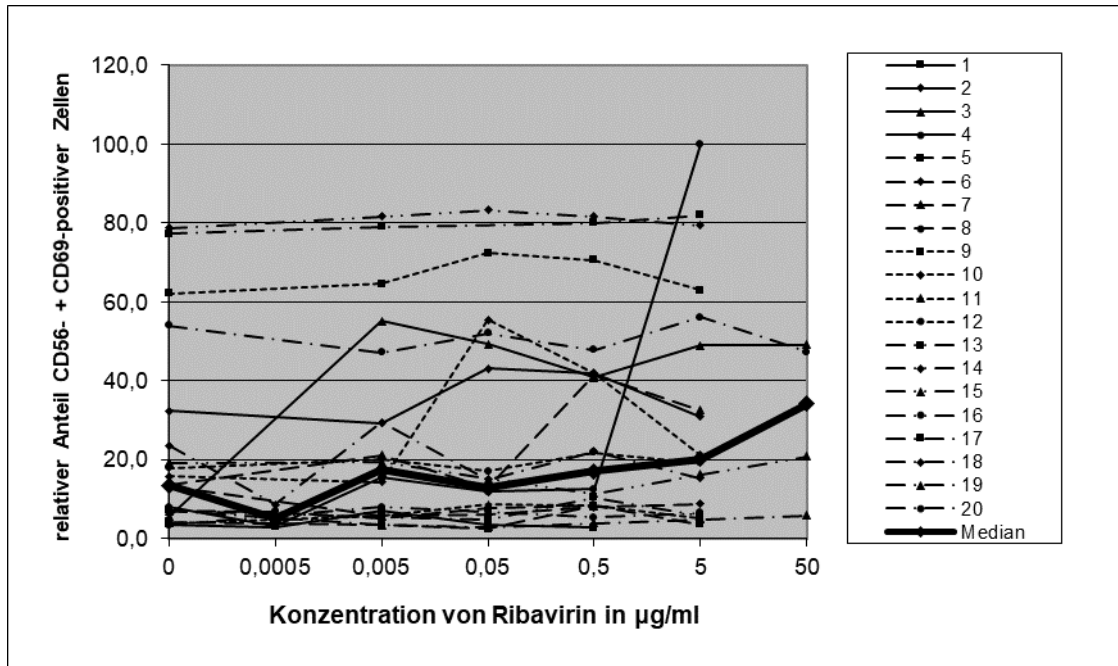
Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 21: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.





**Abbildung 22: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen**

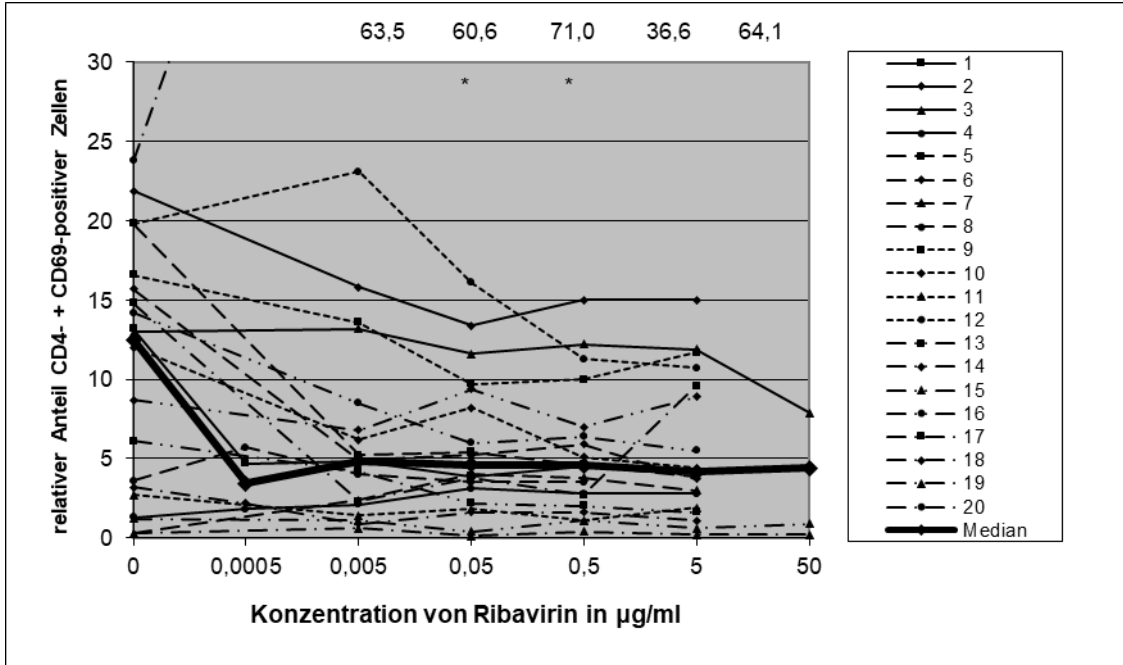
Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.2.2 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit BCG

Nach Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und BCG wurde die CD69-Expression durch CD4- positive Zellen im mittleren Verdünnungsbereich (0,05, 0,5; 5 µg/ml) stimuliert (siehe Abbildung 23), wohingegen die CD69-Expression durch CD8-positive Zellen im mittleren Verdünnungsbereich (0,005 µg/ml) inhibiert wurden (siehe Abbildung 24). Betrachtet man die Mediankurven, kann man erkennen, dass es im Verlauf der Verdünnungsreihe zu keiner signifikanten Veränderung der Werte kam. Allenfalls war ein leichter Anstieg am Anfang der Kurve zu vermerken. Bei den CD4- und CD19-positiven Zellen stiegen die Mediankurven bis in die höchste Konzentration weiter an (siehe Abbildungen 23 und 25), bei den CD8- und CD56-positiven Zellen kam es zu einem Abfall der Kurve (siehe Abbildungen 24 und 26).

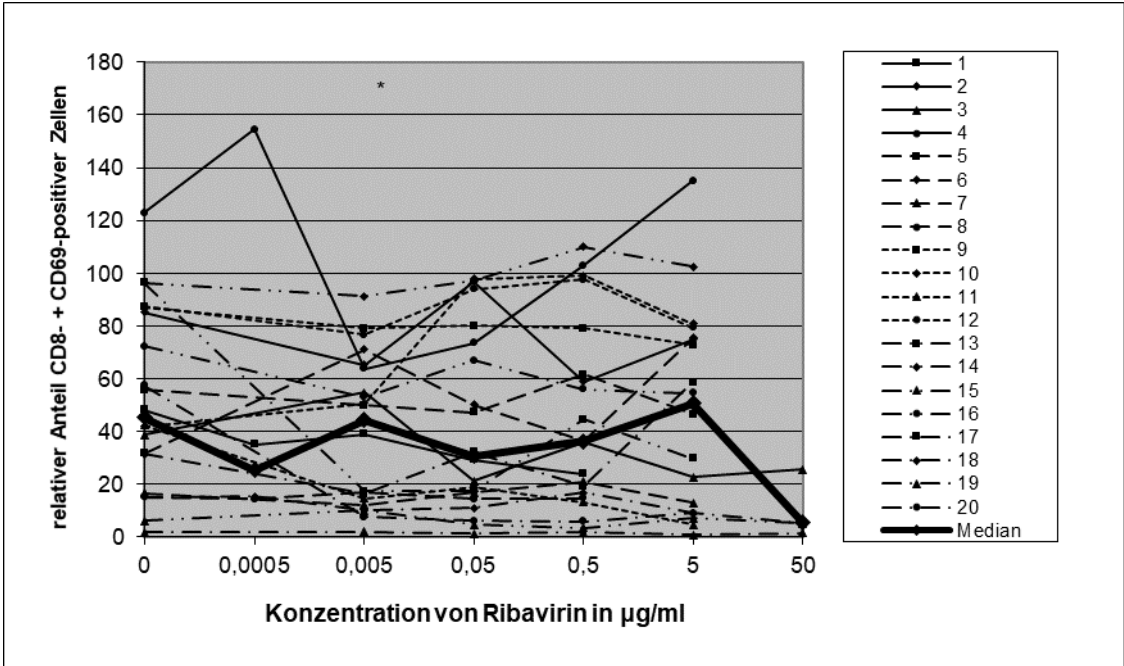
Bei den CD4-positiven Zellen ist zu erwähnen, dass Probanden mit starker Aktivierung bereits im Proliferationsassay hohe SI-Werte hatten (z. B. Proband 12 und 20). Dies kann auch bei einigen Probanden bei den CD8-positiven Zellen (z. B. Proband 4, 12, 13 und 14), den CD19-positiven Zellen (z. B. 4, 12

und 14) und den CD56-positiven Zellen (z. B. Proband 13, 14 und 18) beobachtet werden. Im Vergleich wurden die CD4-positiven Zellen am wenigsten stark und die CD56-positiven Zellen am stärksten aktiviert.



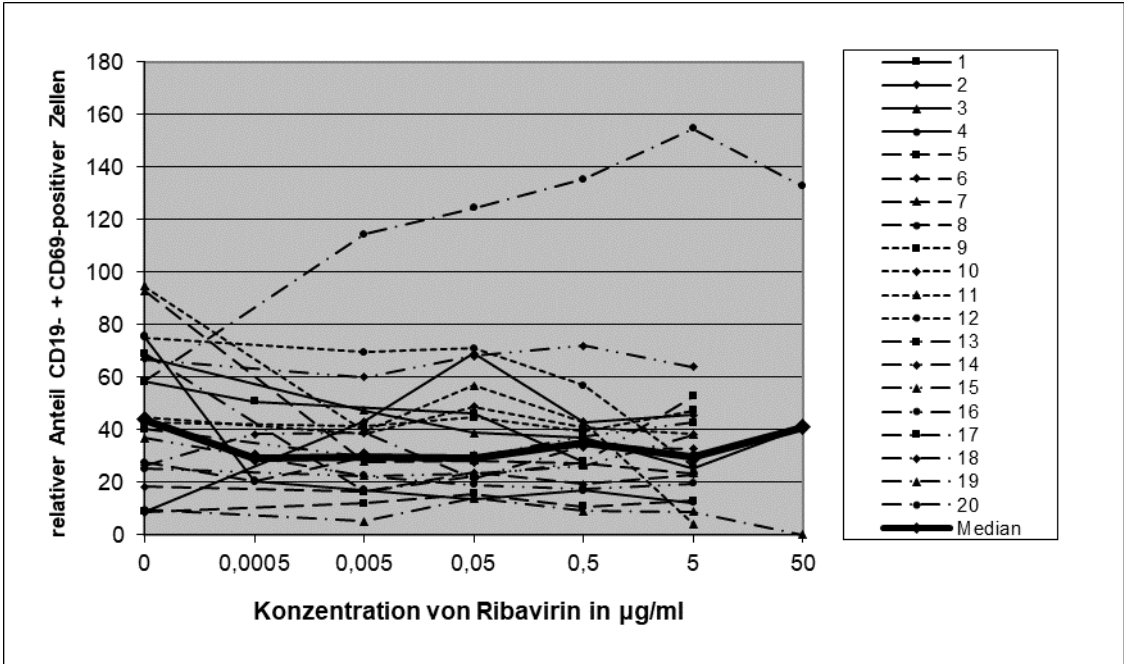
**Abbildung 23: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch BCG auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



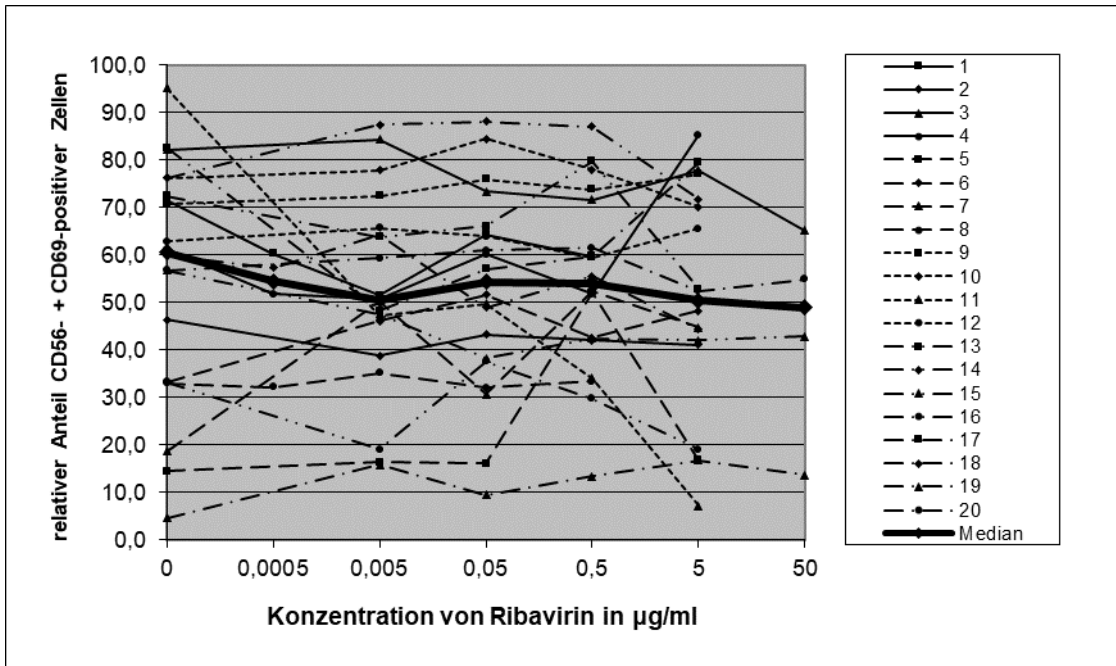
**Abbildung 24: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch BCG auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 25: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch BCG auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

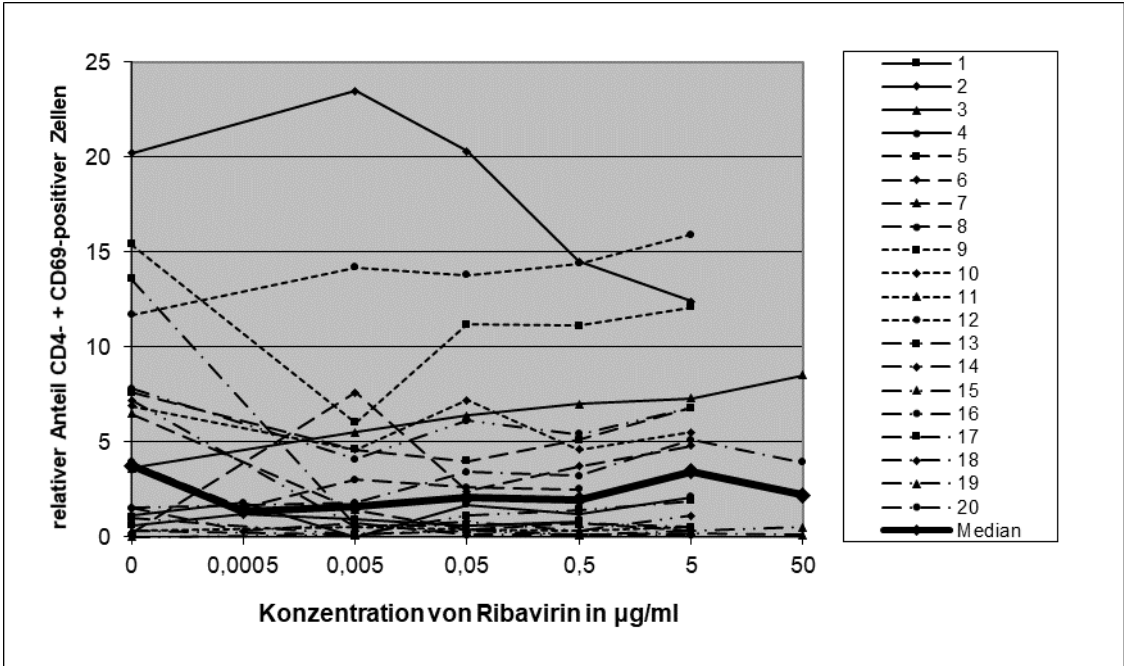


**Abbildung 26: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch BCG auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

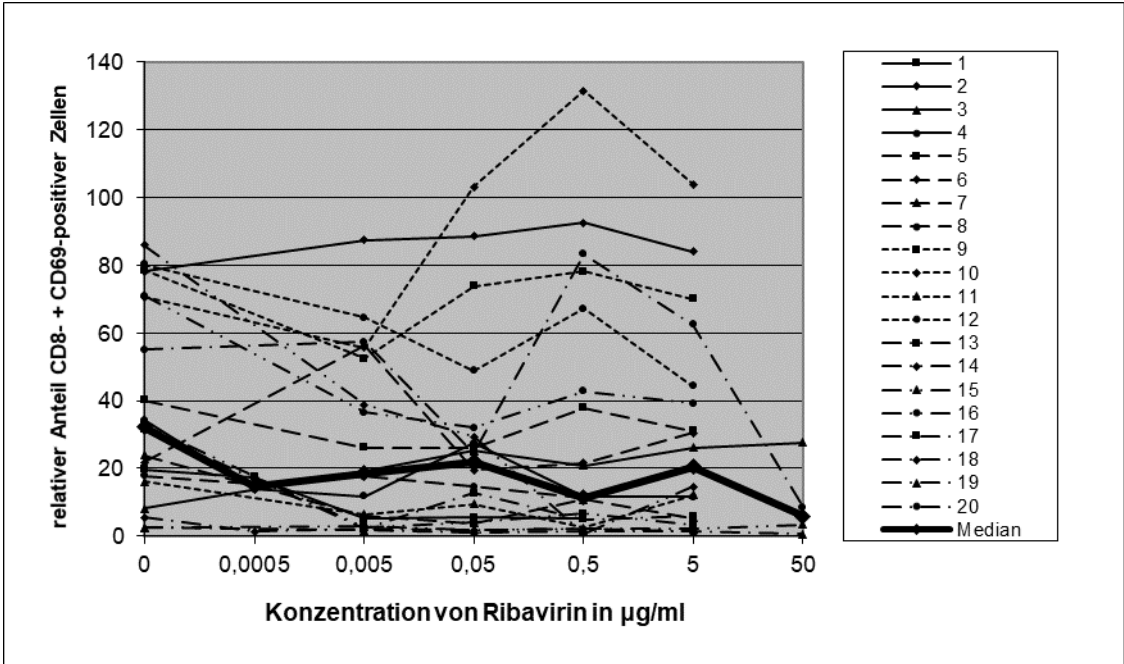
### 3.2.3 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit Tetanol

Die Kostimulation der PBMC mit Ribavirin und Tetanol bewirkte eine Abnahme der Expression von CD69 durch CD19-positive Zellen bei mittlerer Konzentration (0,05 µg/ml) (siehe Abbildung 29). Die CD56-positiven Zellen wurden im oberen Verdünnungsbereich (5 µg/ml) inhibiert (siehe Abbildung 30). Wie bei der Kostimulation mit BCG zeigte sich auch beim Antigen Tetanol, dass die PBMC einiger Probanden mit bereits hohen Stimulationsindices im Proliferationstest auch in der durchflusszytometrischen Analyse größtenteils hohe Messwerte lieferten (z. B. die Probanden 2, 9, 12 und 20). Durchschnittlich am stärksten aktiviert wurden die CD8- und CD56-positiven Zellen, wohingegen die CD4-positiven Zellen nur schwach aktiviert wurden.



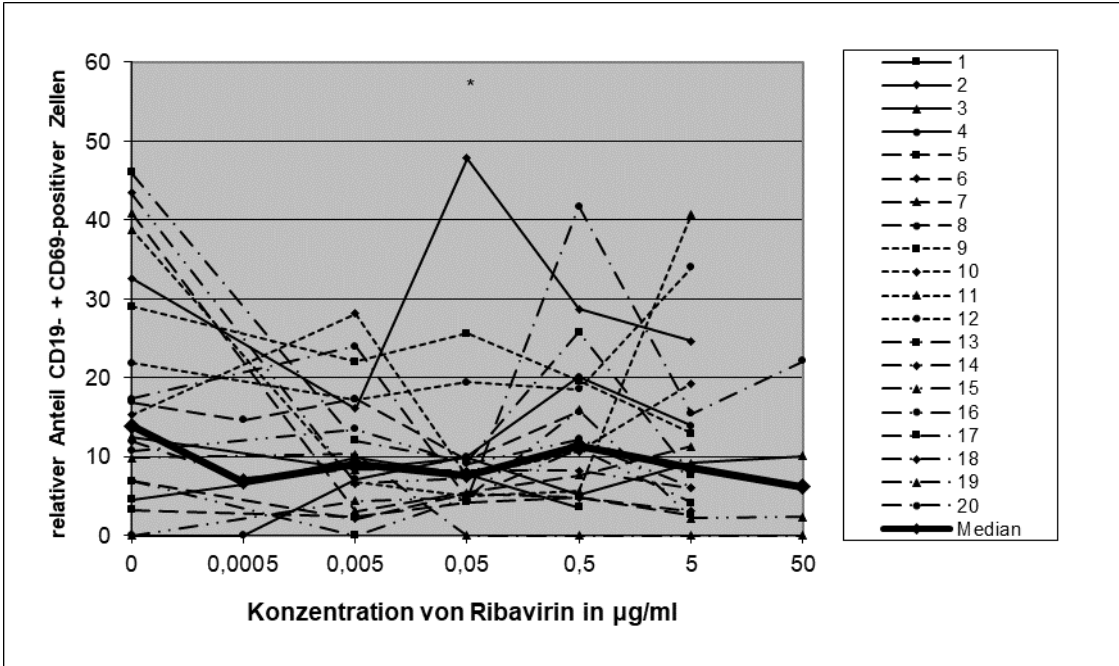
**Abbildung 27: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch Tetanol auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



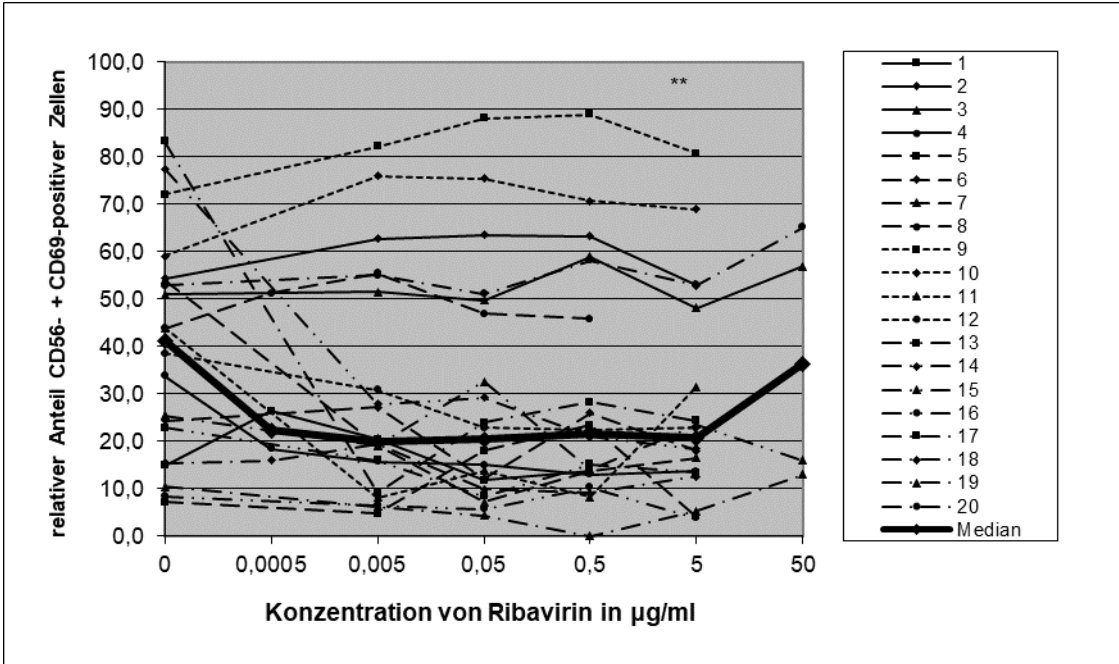
**Abbildung 28: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch Tetanol auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 29: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch Tetanol auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

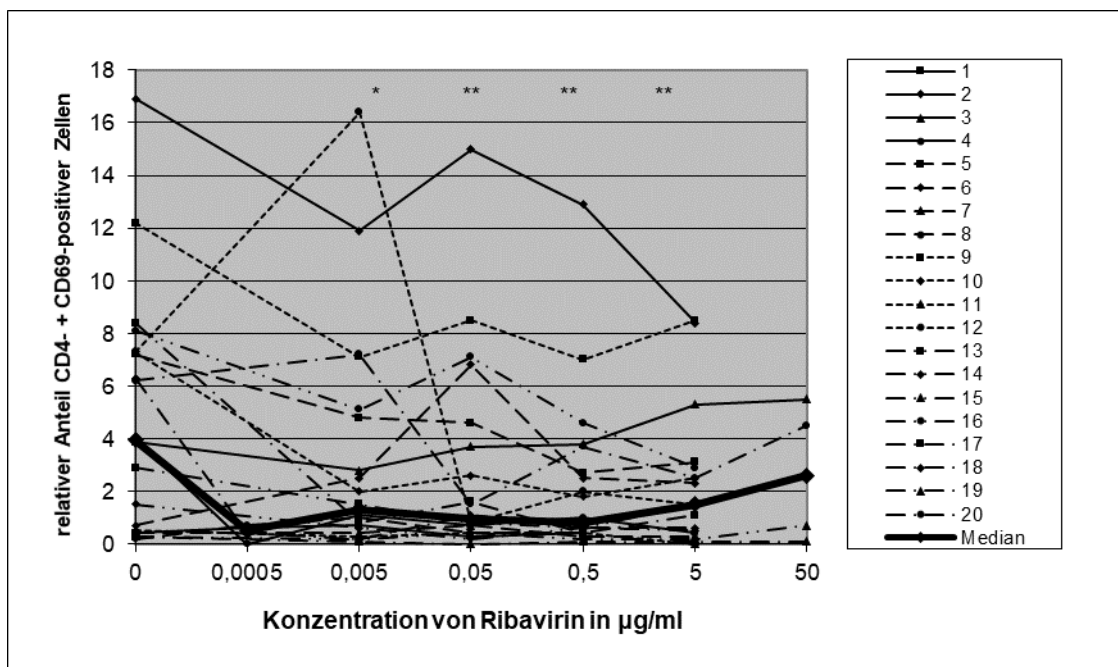


**Abbildung 30: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch Tetanol auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

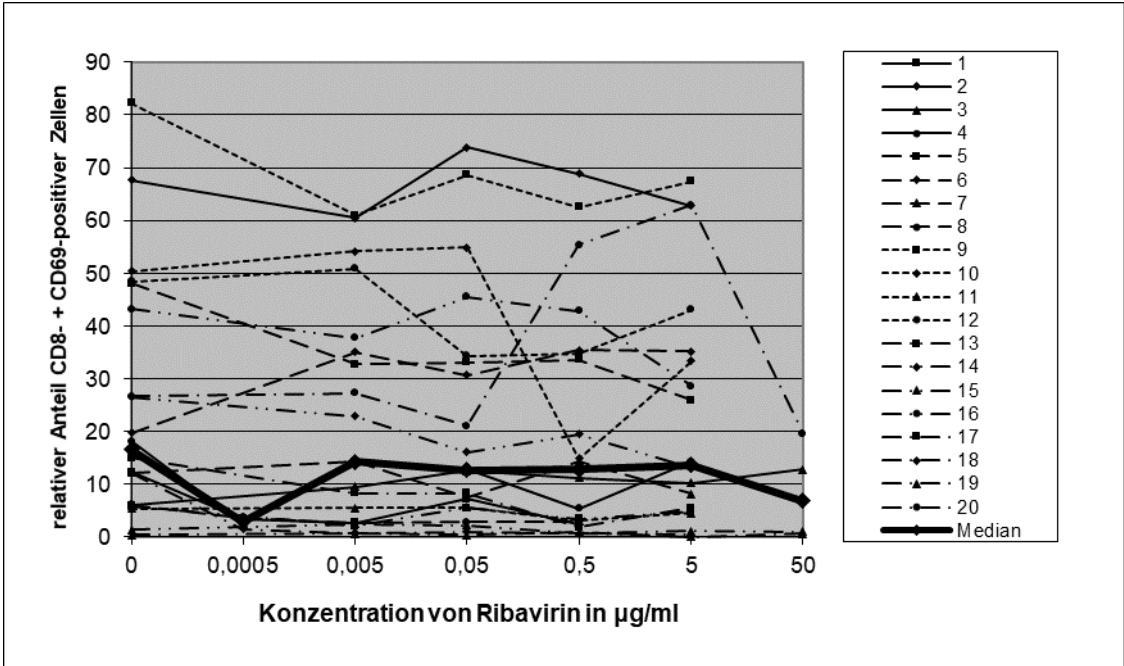
### 3.2.4 Reaktion der PBMC auf Ribavirin nach Kostimulation mit PPD

Stimulierte man die PBMC mit Ribavirin und PPD zeigte sich eine Abnahme der Expression von CD69 durch CD4-positive Zellen im mittleren Verdünnungsbereich (0,005 bis 5 µg/ml) (siehe Abbildung 30). Zudem war eine Inhibierung CD19-positiver Zellen ebenfalls im mittleren Verdünnungsbereich (0,005; 0,5 µg/ml) zu beobachten (siehe Abbildung 33). Wie bei den vorangegangenen Analysen gab es gewisse Parallelen, was das Proliferationsverhalten anbelangt. So wiesen beispielsweise die Lymphozytenüberstände der Probanden 2, 9 und 12 sowohl im Proliferationsassay als auch bei der Durchflusszytometrie hohe Messwerte bei der Kostimulation von Ribavirin mit PPD auf. Im Durchschnitt war die CD69-Bildung der CD4-positiven Zellen am wenigsten und die der CD8-positiven Zellen am stärksten ausgeprägt.



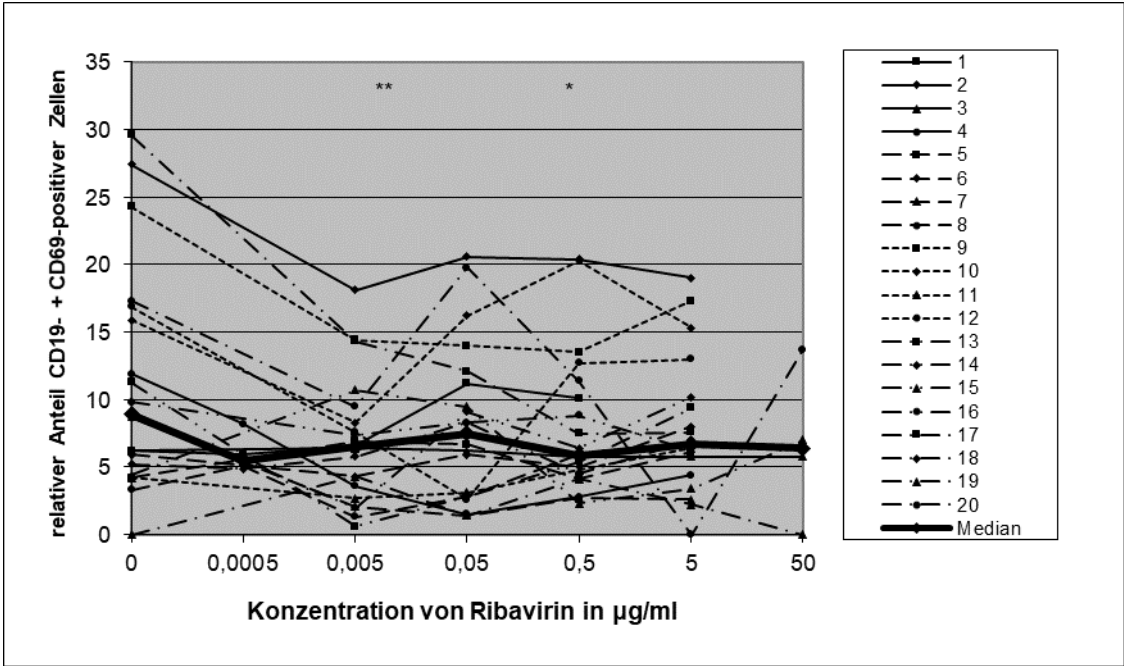
**Abbildung 31: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch PPD auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 32: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

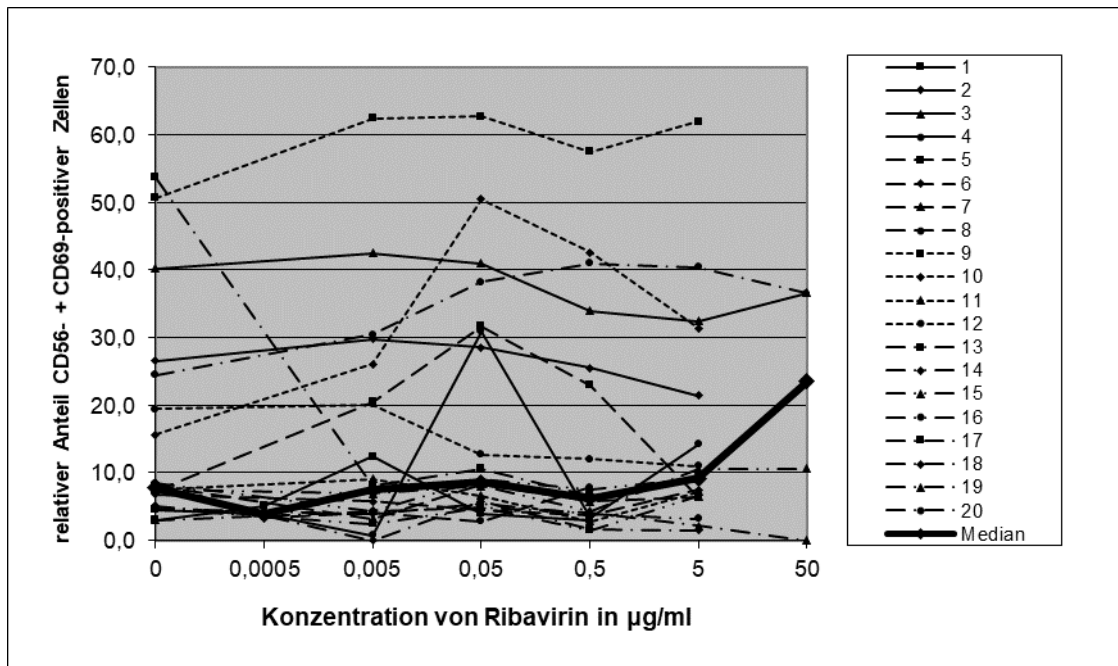
Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch PPD auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 33: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch PPD auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



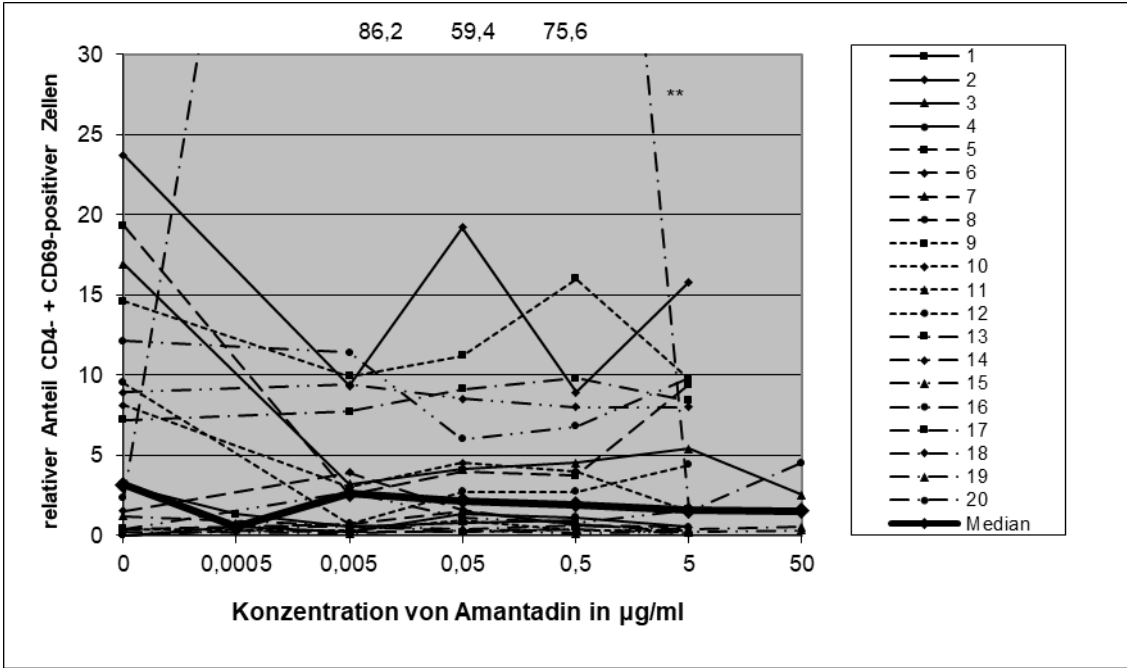


**Abbildung 34: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin nach Kostimulation durch PPD auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

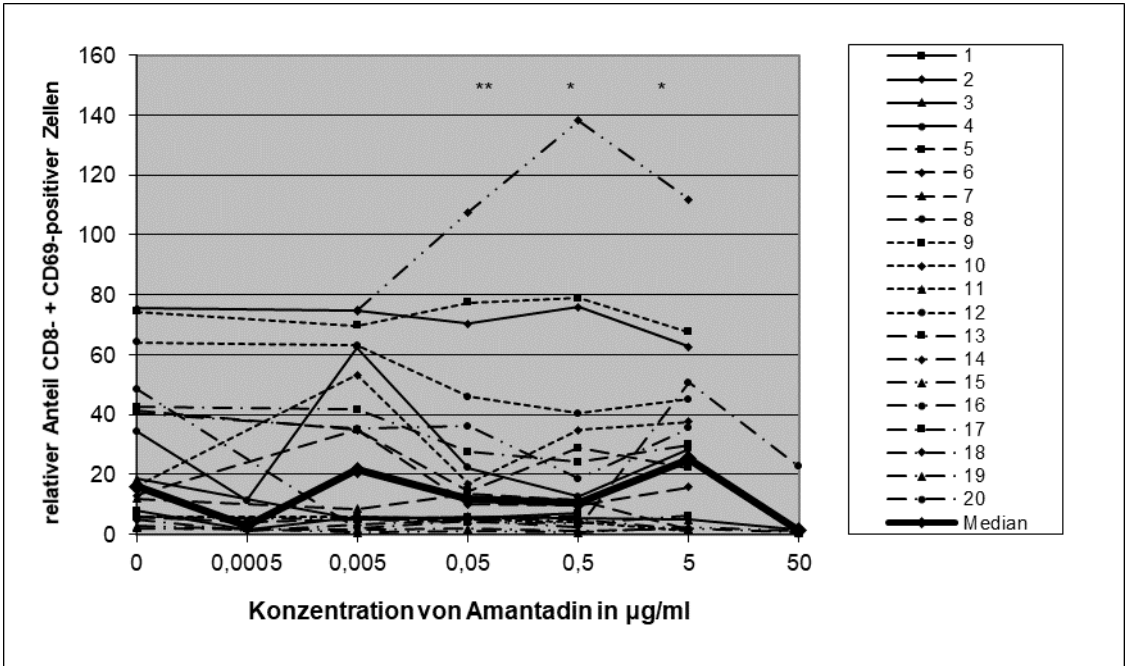
### 3.2.5 Reaktion der PBMC auf Amantadin ohne Kostimulation

Amantadin wirkte sich ohne Kostimulus inhibierend auf die CD69-Expression durch CD4-positive Zellen im oberen Verdünnungsbereich (5 µg/ml) aus (siehe Abbildung 35). Zudem kam es bei den CD8-positiven Zellen zu einer Inhibierung bei den mittleren Konzentrationen (0,05 und 0,5 µg/ml) und einer Aktivierung im höheren Verdünnungsbereich (5 µg/ml) (siehe Abbildung 35). Einige Probanden zeigten hohe Stimulierungswerte über alle Zellreihen hinweg (z. B. Proband 2, 9 und 12). Bei der 0,0005 µg/ml Konzentration von Amantadin kam es noch zu keiner wesentlichen Aktivierung der Zellen.



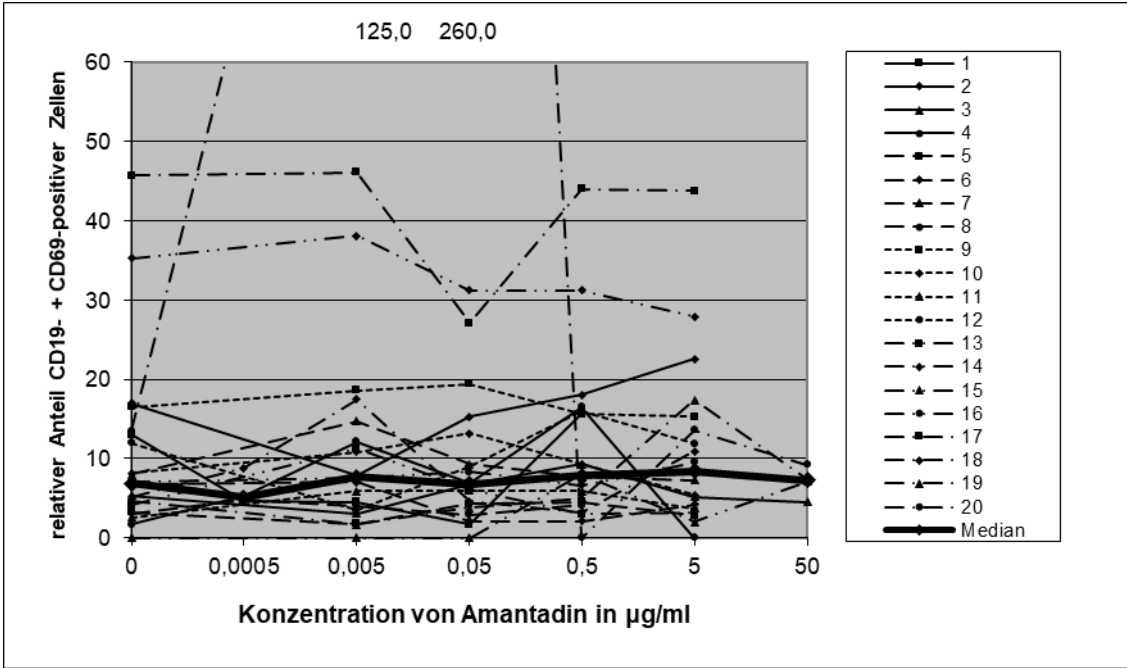
**Abbildung 35: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen nach 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



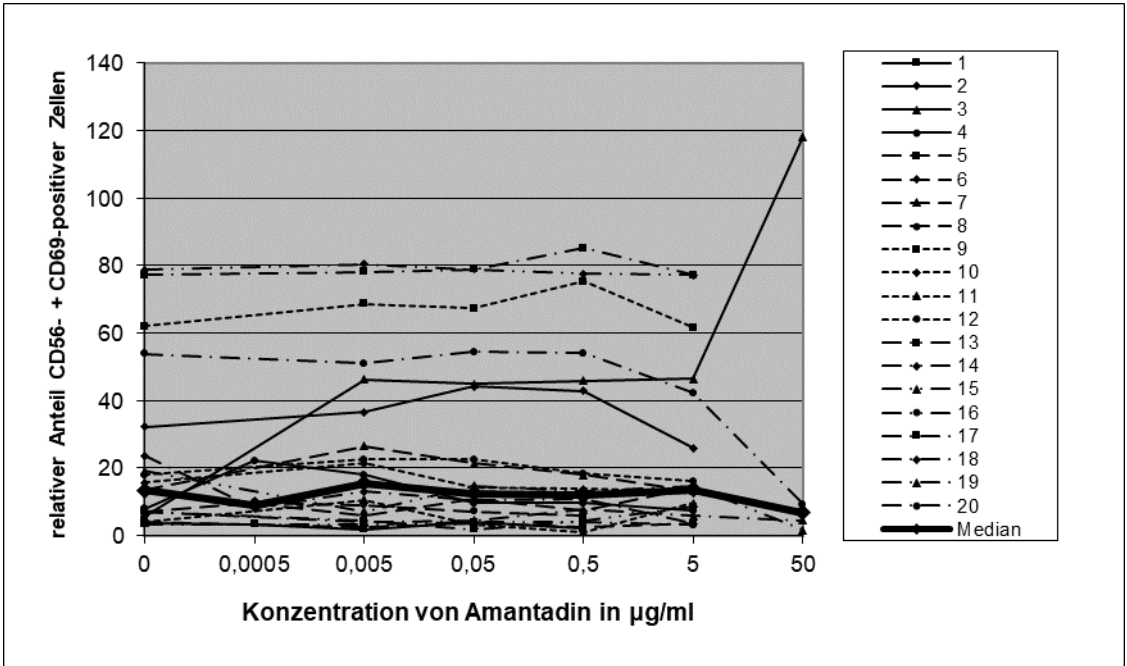
**Abbildung 36: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 37: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

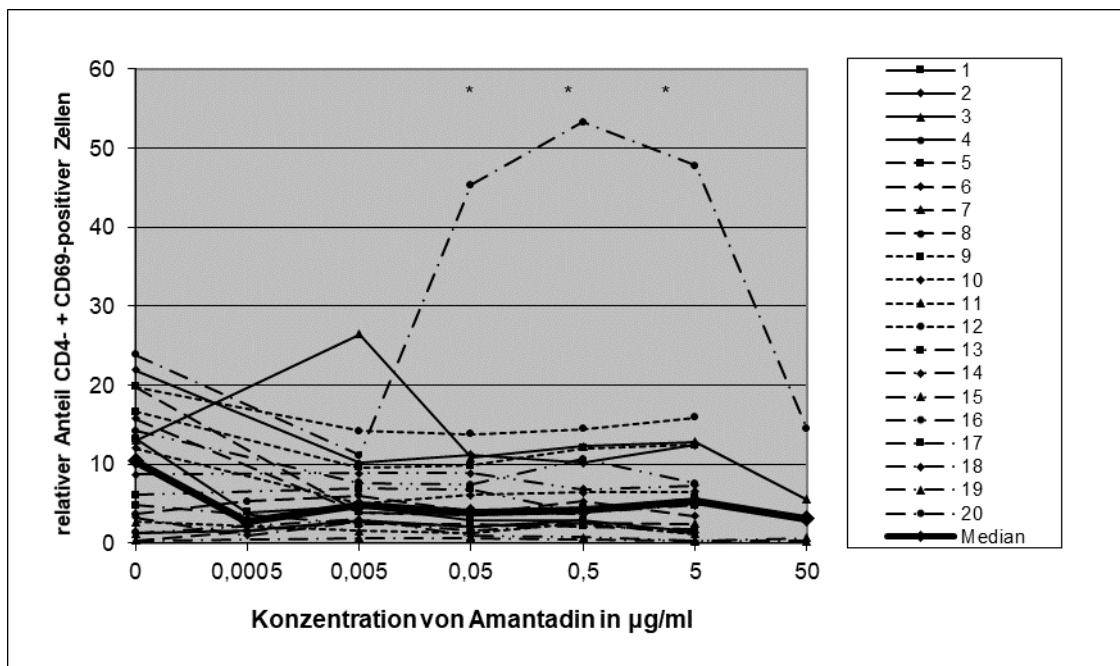


**Abbildung 38: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

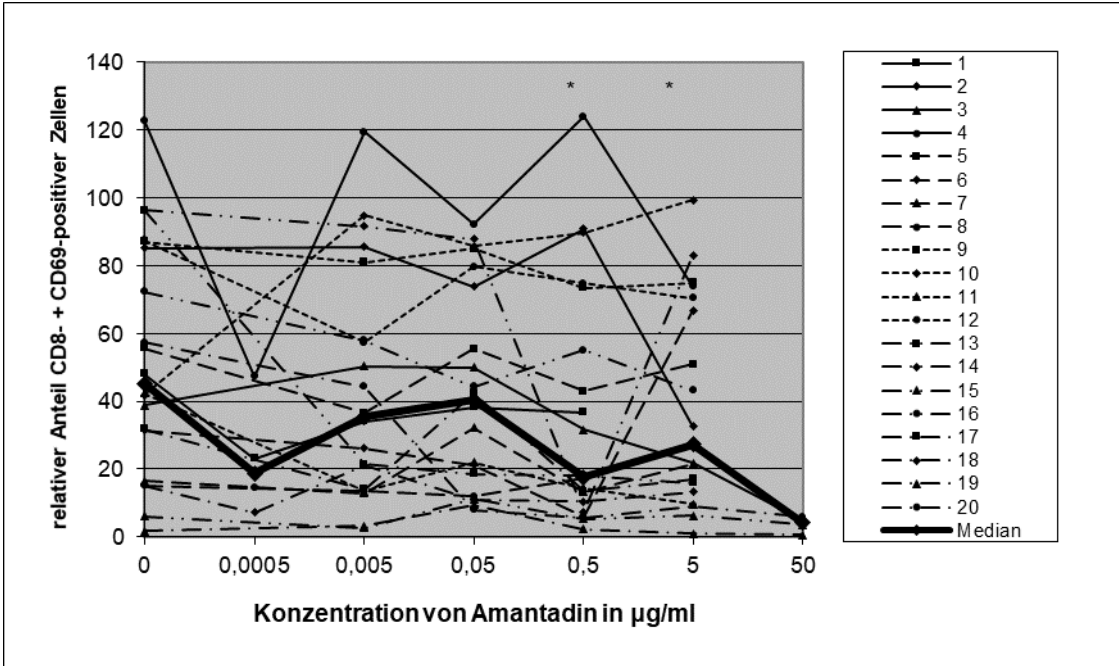
### 3.2.6 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit BCG

Die Kostimulation mit Amantadin und BCG bewirkte eine Inhibierung CD4-positiver Zellen bei den Verdünnungen 0,05, 0,5 und 5 µg/ml (siehe Abbildung 38). Bei den CD8-positiven Zellen kam es bei den mittleren Konzentrationen zu einer Inhibierung der CD69-Expression (siehe Abbildung 39). Ebenfalls gehemmt wurde die Expression der CD69-Zellen durch CD56-positive Zellen im oberen Verdünnungsbereich (siehe Abbildung 41). Ähnlich wie bei Ribavirin konnte man auch bei der Stimulierung mit Amantadin und BCG eine Parallele zwischen dem Proliferationsassay und der durchflusszytometrischen Analyse erkennen. So erzielten beispielsweise die PBMC der Probanden 4, 12 und 14 in beiden Tests im Vergleich zu den anderen Messwerten höhere Werte. Allgemein kann man sagen, dass die CD4-positiven Zellen am wenigstens und die CD56-positiven am stärksten aktiviert wurden.



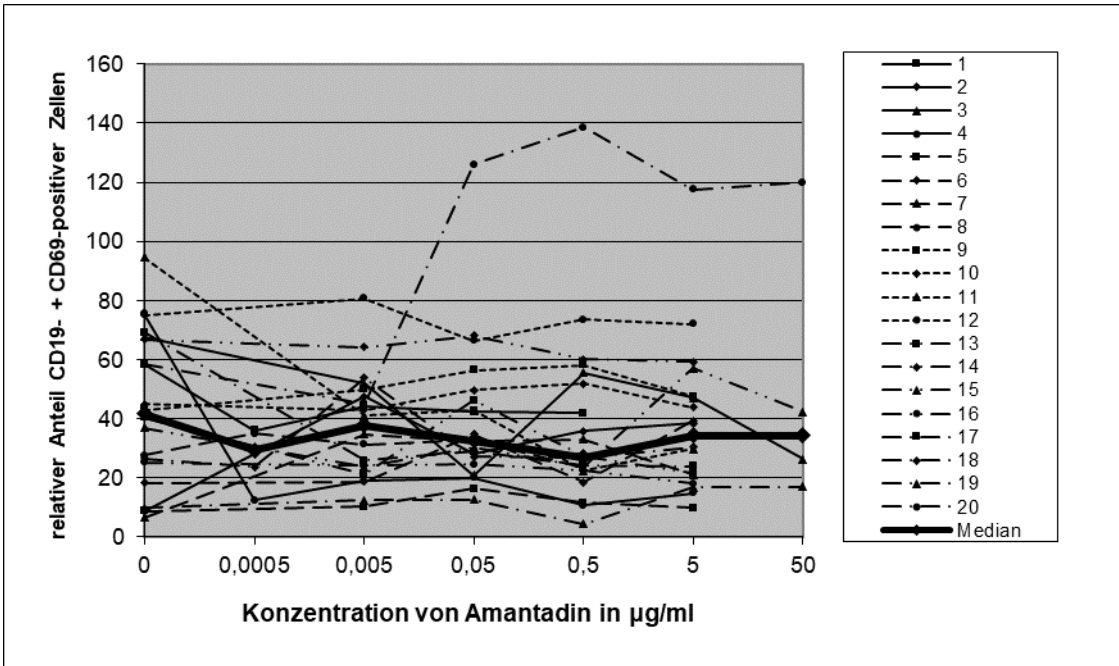
**Abbildung 39: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit BCG auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



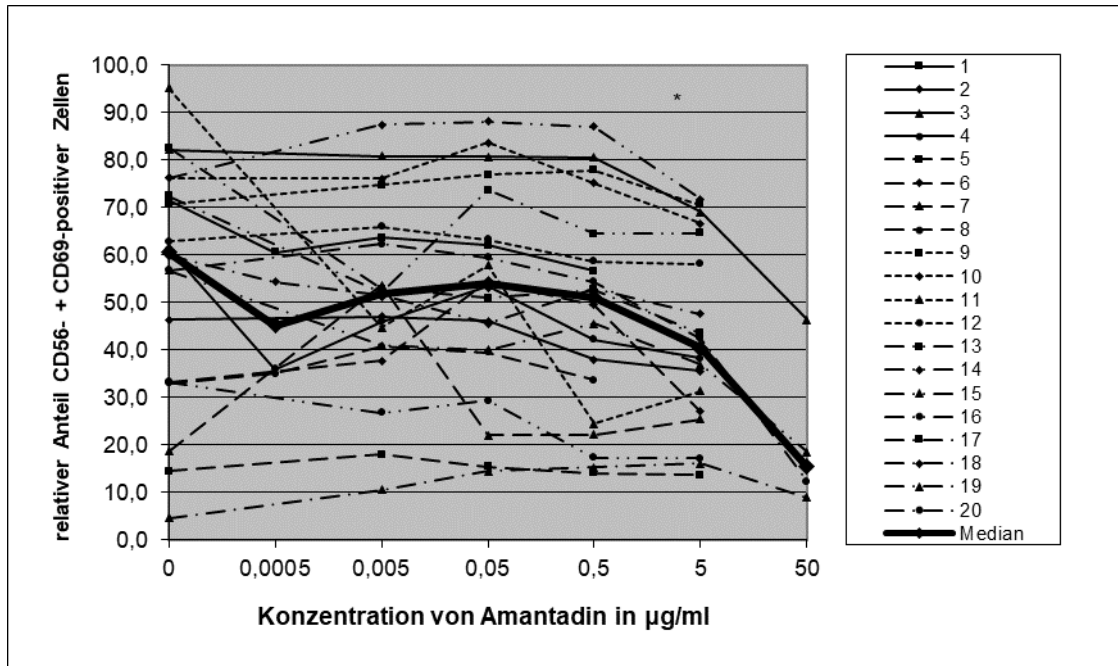
**Abbildung 40: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit BCG auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 41: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit BCG auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

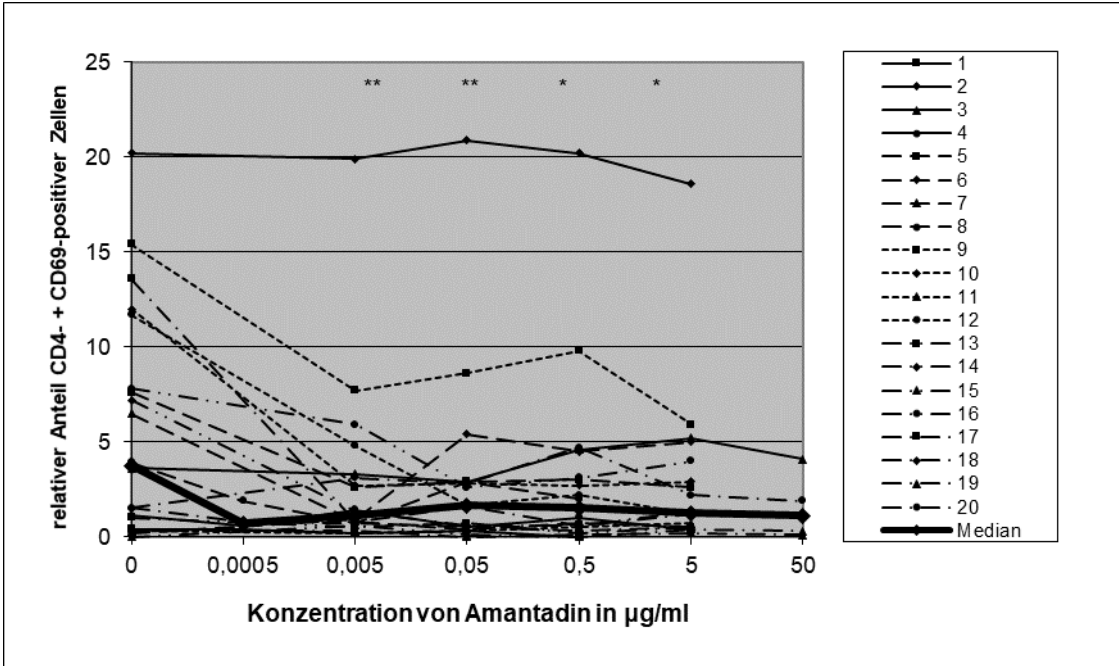


**Abbildung 42: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit BCG auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.

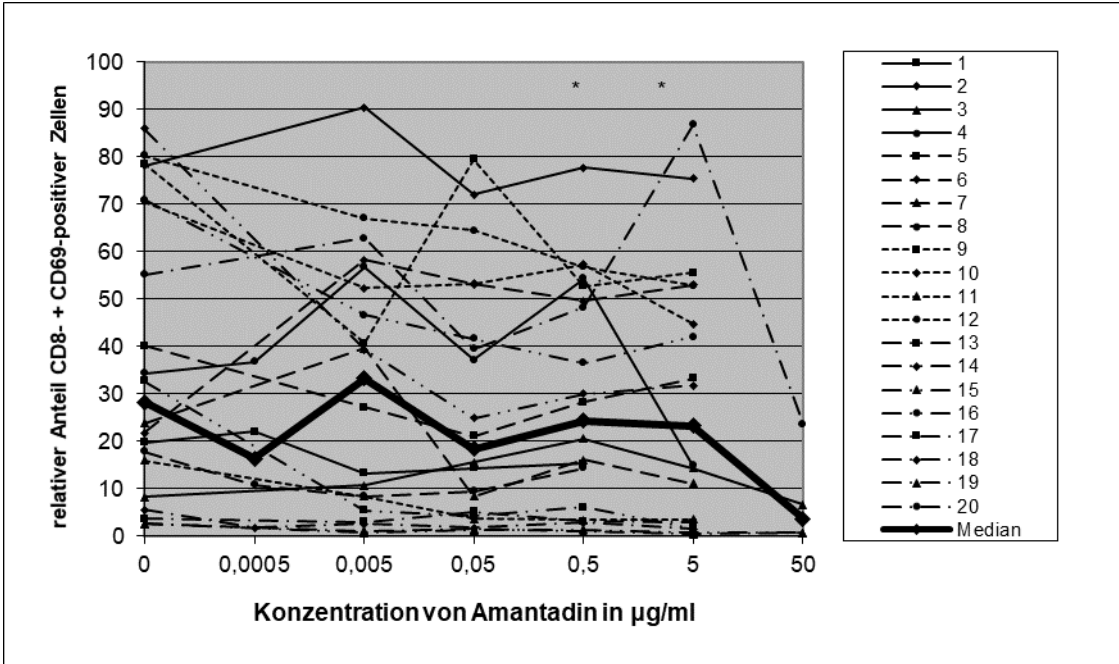
### 3.2.7 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol

Die Kostimulation mit Amantadin und Tetanol bewirkte eine Inhibierung CD4-positiver Zellen im über einen größeren Verdünnungsbereich statt (0,005 bis 5 µg/ml) (siehe Abbildung 43). Ebenso wurden CD8-positiv Zellen (0,5; 5 µg/ml) (siehe Abbildung 44) und CD19-positiv Zellen im mittleren Verdünnungsbereich (0,05 µg/ml) gehemmt (siehe Abbildung 45). Die CD69-Expression durch CD56-positiv Zellen nahm bei einigen Verdünnungen ab (0,005; 0,5; 5 µg/ml) (siehe Abbildung 46). Betrachtet man vergleichend den Proliferationsassay, so erkennt man abermals eine Parallele zwischen den höheren Messwerten in der Durchflusszytometrie und höherer SI-Werte im Proliferationsassay (z. B. Proband 2 und 12). Die Mittelwertskurve verlief in allen Zelllinien ähnlich, nämlich ab der 0,005 µg/ml Konzentration relativ waagrecht und schließlich abfallend in der höchsten Konzentration. Am stärksten wurden die CD8- und CD56-positiv Zellen, am schwächsten die CD4-positiv Zellen aktiviert.



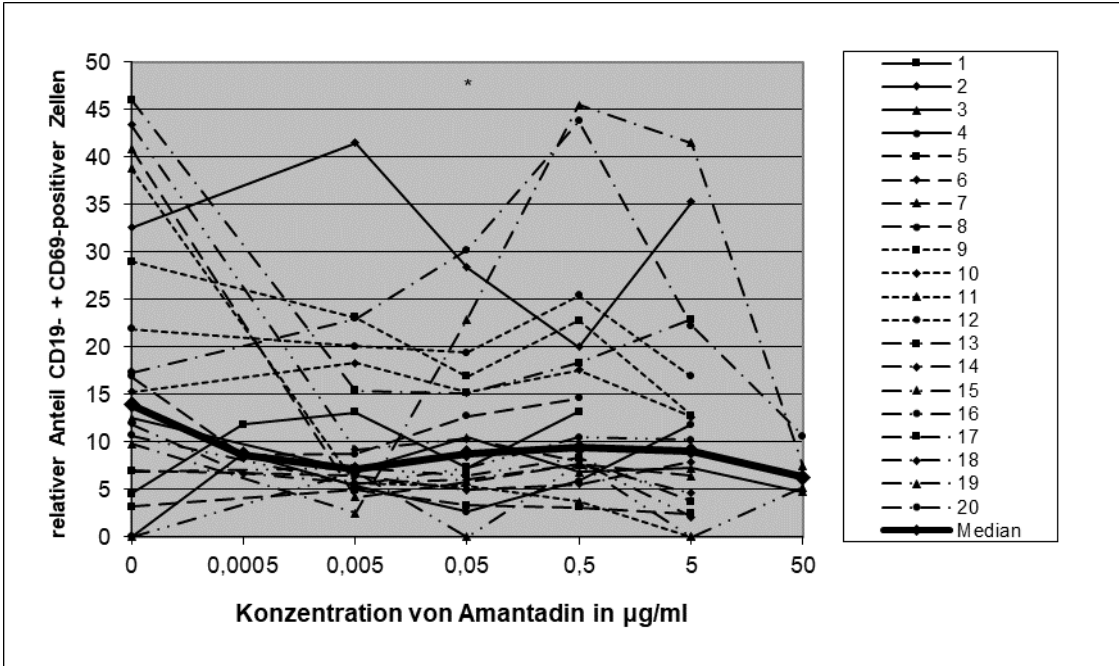
**Abbildung 43: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



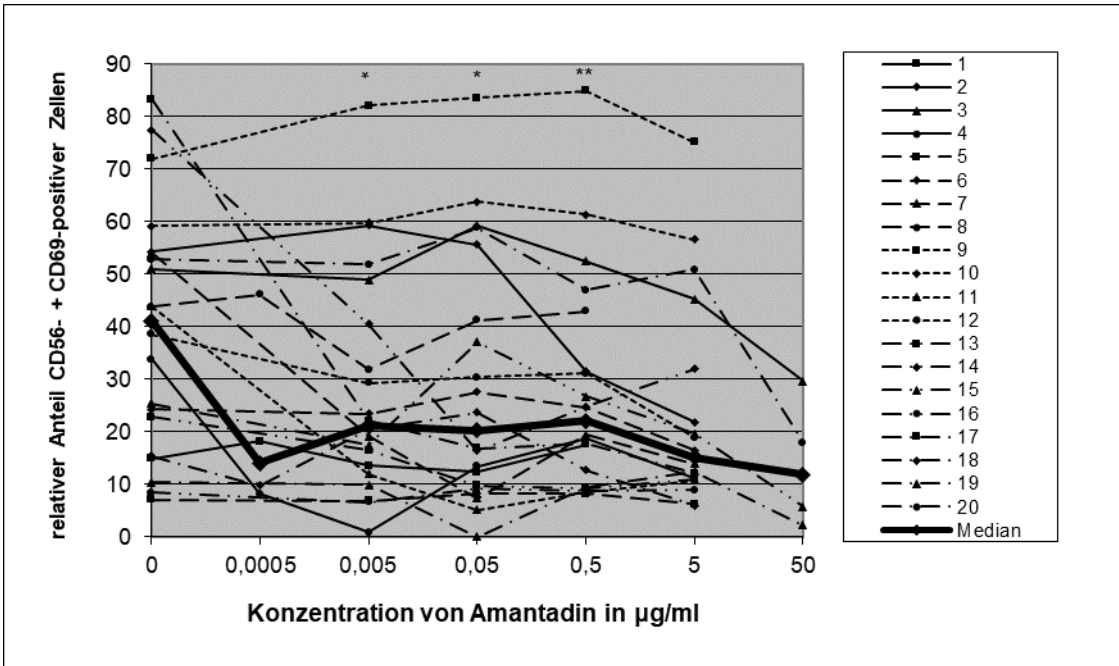
**Abbildung 44: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 45: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



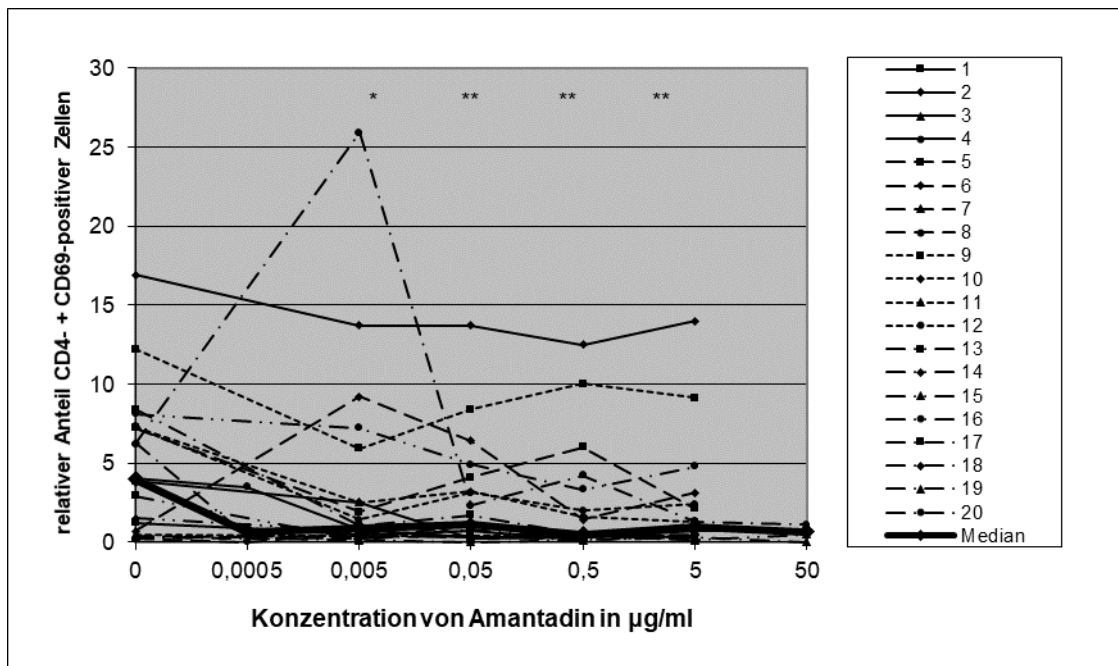
**Abbildung 46: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit Tetanol auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



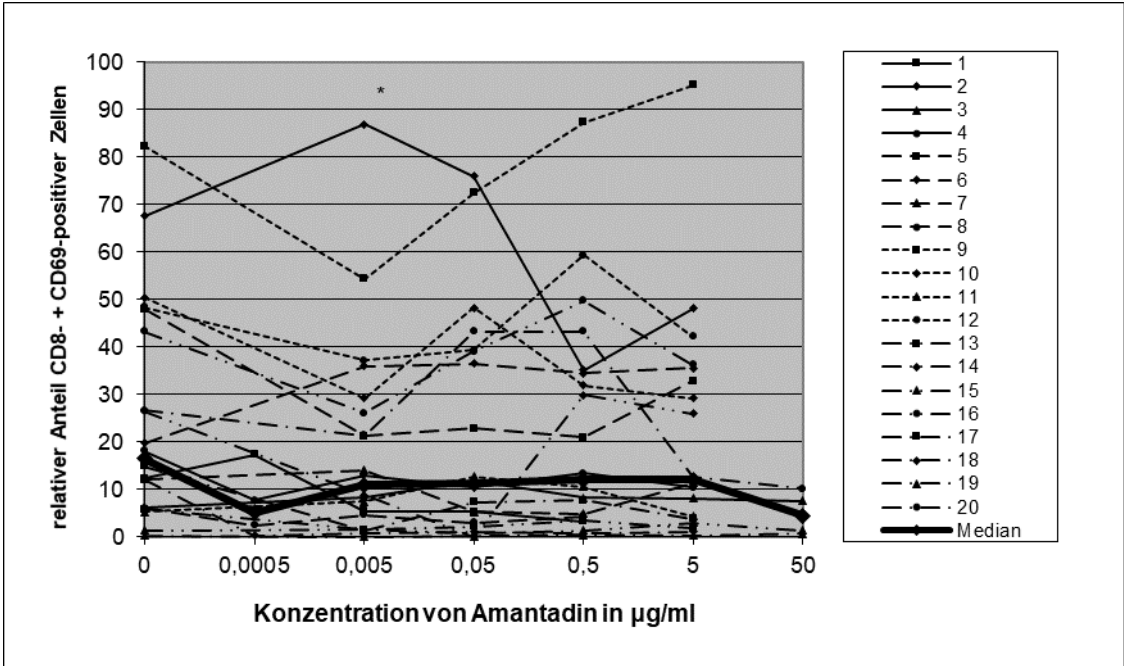
### 3.2.8 Reaktion der PBMC auf Amantadin nach Kostimulation mit PPD

Stimulierte man die PBMC mit Amantadin und PPD kam es zu einer Abnahme der Expression von CD69 durch CD4- (Verdünnung 0,005 bis 5 µg/ml) (siehe Abbildung 47) und CD8-positive Zellen (Verdünnung 0,005 µg/ml) (siehe Abbildung 48). Auch CD19-positive Zellen wurden über mehrere Verdünnungen (0,005 bis 5 µg/ml) hinweg inhibiert (siehe Abbildung 49). Abermals reagierten einige Probanden in der Durchflusszytometrie analog zum Proliferationsassay mit höheren Messwerten (z. B. Proband 12, 16 und 20). Abermals war die CD69-Expression bei den CD8-positiven Zellen am stärksten und bei den CD4-positiven Zellen am schwächsten.

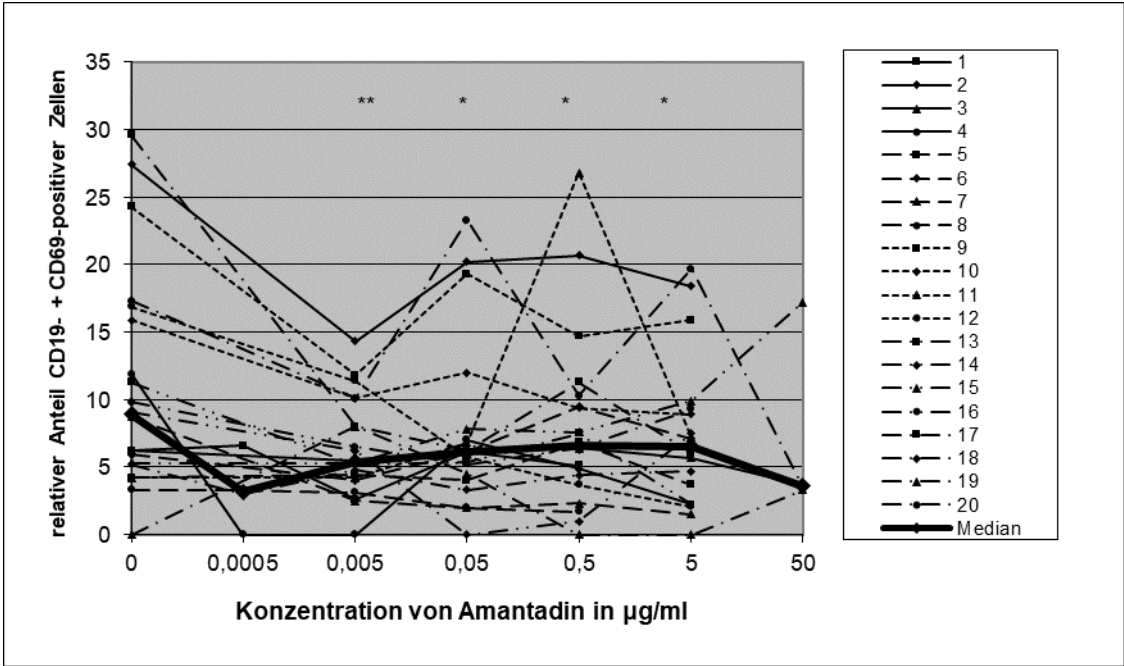


**Abbildung 47: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

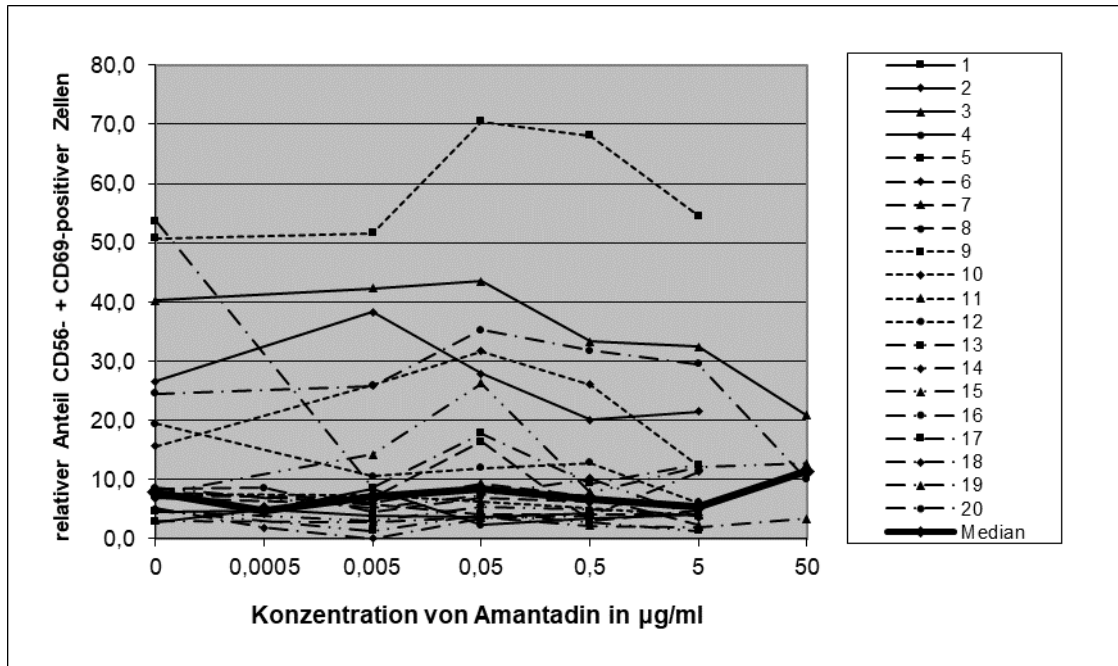
Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit PPD auf die Aktivierung CD4-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 48: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit PPD auf die Aktivierung CD8-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 49: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit PPD auf die Aktivierung CD19-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 50: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Amantadin nach Kostimulation mit PPD auf die Aktivierung CD56-positiver Zellen bei 20 gesunden Probanden. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Ribavirin bewirkte in dieser Arbeit ohne Kostimulans eine signifikante Aktivierung der CD4- und CD19-positiven Zellen im mittleren Konzentrationsbereich. Im Durchschnitt reagierten die CD4-positiven Zellen am geringsten und die CD8- und teilweise die CD56-positiven Zellen am stärksten. Durch Inkubation von Ribavirin mit dem Makrophagen-aktivierenden BCG wurden CD4- positive Zellen (u. a. Makrophagen) im mittleren Verdünnungsbereich signifikant aktiviert, wohingegen CD8- positive Zellen (zytotoxische Zellen) im mittleren Verdünnungsbereich signifikant inhibiert wurden, was der Suppression der PBMC-Produktion im Proliferationsassay entsprach.

Bei der Kostimulation von Ribavirin mit Tetanol konnte eine signifikante Abnahme der Aktivierung von CD19- bzw. CD56-positiven Zellen im mittleren bzw. oberen Verdünnungsbereich beobachtet werden. Diese Inhibierung im mittleren Konzentrationsbereich von Ribavirin war bereits im Proliferationsassay beobachtet worden.

Nach Schaffung eines TH1-Milieus durch Kostimulation von Ribavirin mit PPD kam es im mittleren Konzentrationsbereich bei den CD4- und CD19-positiven Zellen zu einer signifikanten Inhibierung der CD69-Expression.

Amantadin wirkte sich ohne Kostimulus inhibierend auf die CD69-Expression durch CD4-positive Zellen im oberen Verdünnungsbereich aus. Zudem kam es bei den CD8-positiven Zellen zu einer signifikanten Inhibierung bei den mittleren Konzentrationen und einer signifikanten Aktivierung im höheren Verdünnungsbereich. Einige Probanden zeigten hohe Stimulierungswerte über alle Zellreihen hinweg, was allerdings zu keiner signifikanten CD69-Aktivierung führte.

Ähnlich wie bei Ribavirin konnte man auch bei der Stimulierung der PBMC durch Amantadin mit den Antigenen BCG, Tetanol und PPD eine Parallele zwischen den Ergebnissen des Proliferationsassay und der durchflusszytometrischen Analyse erkennen.

Die Kostimulation von Amantadin durch BCG bewirkte eine signifikante Inhibierung der CD4- und CD8-positiven Zellen im mittleren und der CD56-positiven Zellen im oberen Konzentrationsbereich.

Bei der Kostimulation von Amantadin mit Tetanol fand eine signifikante Inhibierung CD4-positiver Zellen im unteren bis oberen Verdünnungsbereich statt. Ebenso wurden CD8- und CD19-positive Zellen im mittleren Verdünnungsbereich gehemmt.

Die Kostimulation von Amantadin durch PPD bewirkte eine signifikante Abnahme von CD69 bei CD4- und CD19 bzw. CD8-positiven Zellen im unteren bis oberen bzw. unteren Konzentrationsbereich.

### **3.3 Zytokin-ELISA**

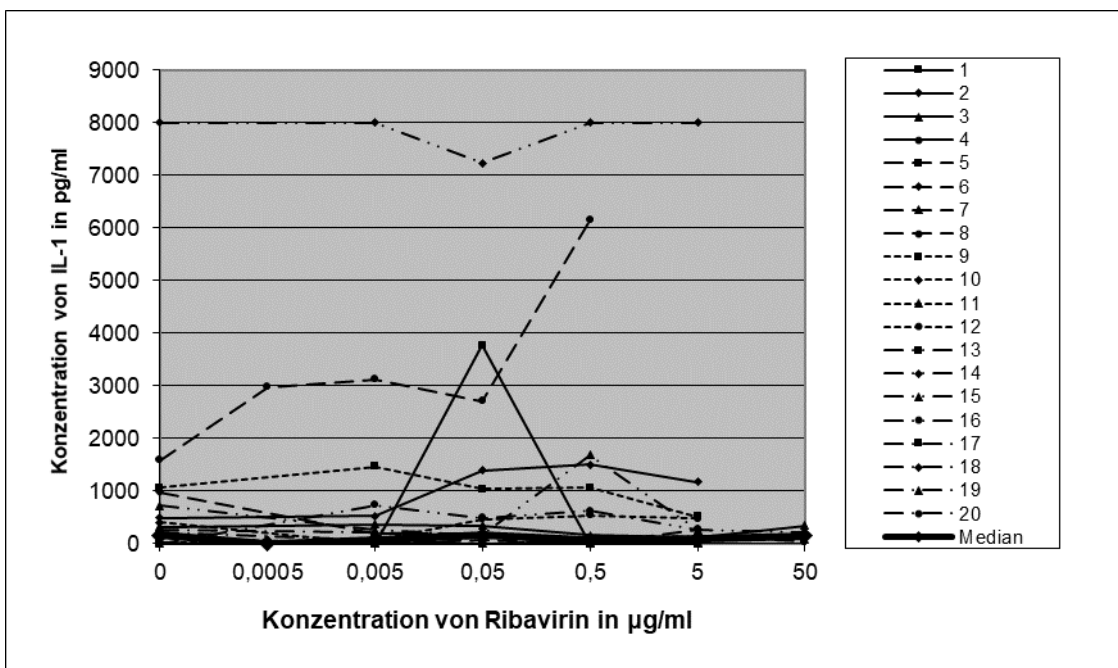
#### **3.3.1 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion**

##### **Makrophagentypischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch PBMC**

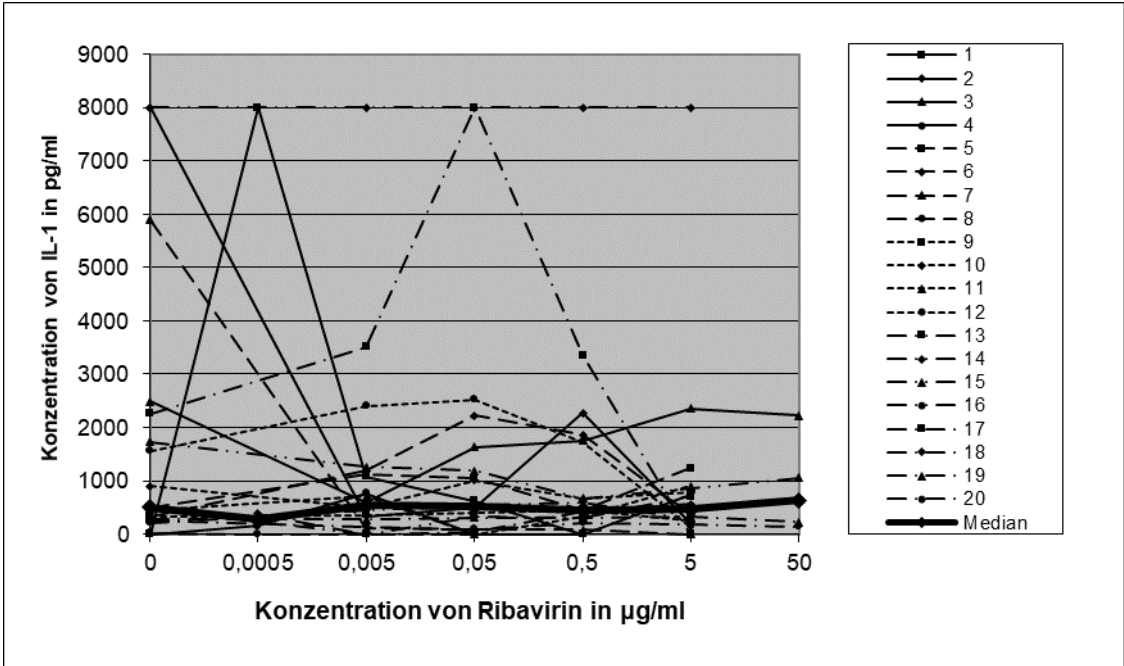
In Abwesenheit von Ribavirin erreichte die IL-1-Produktion durch PBMC bei gut der Hälfte der Probanden den Grenzwert, ab der der Nachweis von IL-1 als positiv gilt (IL-1: 250 pg/ml) (siehe Abbildungen 51 bis 54). In den wenigstens Fällen kam es nach Zugabe von Ribavirin zu einem Absinken der Messwerte über alle Verdünnungen hinweg. Die Werte blieben weitestgehend stabil oder stiegen an. Die Kurvenverläufe der Medianwerte von IL-1 verliefen flach. Es kam außer bei der Kostimulation mit Tetanol im mittleren Konzentrationsbereich (0,05  $\mu$ g/ml), durch die es zu einer Supprimierung der IL-1-Produktion kam (siehe Abbildung 53), zu keiner signifikanten Stimulierung oder Supprimierung. Einige Probanden (z. B. Proband 1 und 14) fielen durch sehr hohe Messwerte sowohl bei Ribavirin alleine als auch nach Kostimulation mit den Antigenen auf, allerdings ließ sich keine Regelmäßigkeit in den Kurvenverläufen erkennen.

Bei der IL-6-Produktion kam es wie bei der IL-1-Produktion zu Messwerten oberhalb der Nachweisgrenze von IL-6 bei Abwesenheit von Ribavirin (IL-6: 250 pg/ml) (siehe Abbildungen 55 bis 58). Wie bei den IL-1-Zytokinen verliefen die meisten Kurven nach Zugabe von Ribavirin recht flach, wobei es bei einigen zu einem starken Abfall der Werte kam. Zudem wurden bei der IL-6-Produktion wesentlich höhere Werte erreicht. Bereits ohne Zugabe von Ribavirin oder ein Antigen kam es zu einem Mittelwert von 3420 pg/ml (siehe Abbildung 55). Die Zugabe von Ribavirin bewirkte höhere Mittelwerte. Durch BCG alleine wurde ein Mittelwert von 7411 pg/ml erreicht (siehe Abbildung 56). Allerdings blieben die Zytokinwerte durch die weitere Zugabe von Ribavirin weitgehend unbeeinflusst. Nach Kostimulation durch Tetanol wurden durchschnittlich niedrigere Messwerte erreicht und es kam im mittleren Verdünnungsbereich (0,005 bis 0,5  $\mu$ g/ml) zu einer Suppression der IL-6-Produktion und in höherer Konzentration von Ribavirin (5  $\mu$ g/ml) zu einer Stimulierung (siehe Abbildung 57).

Anders als bei den Zytokinen IL-1 und IL-6 erreichte der Großteil der TNF-alpha-Zytokine ohne Zugabe von Ribavirin die Nachweisgrenze von TNF-alpha nicht (TNF-alpha: 312 pg/ml), was sich auch nach Zugabe von Ribavirin nicht änderte (siehe Abbildungen 59 bis 62). Bei der TNF-alpha-Produktion wurden Mittelwerte von maximal 715 pg/ml erreicht. Alle Mediankurven verliefen flach. Bei der Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und Tetanol wurde im oberen Verdünnungsbereich (5 µg/ml) die TNF-alpha-Bildung signifikant stimuliert (siehe Abbildung 61). Die PBMC eines Probanden (12) zeigten bei allen Antigenen überdurchschnittlich hohe Messwerte.

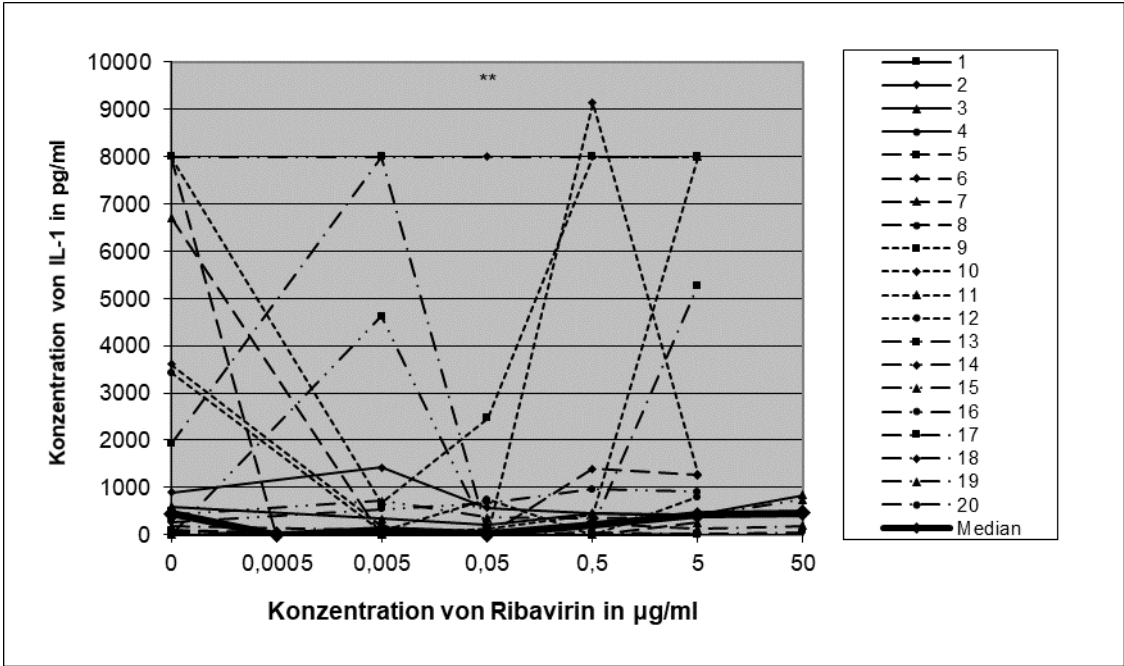


**Abbildung 51: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



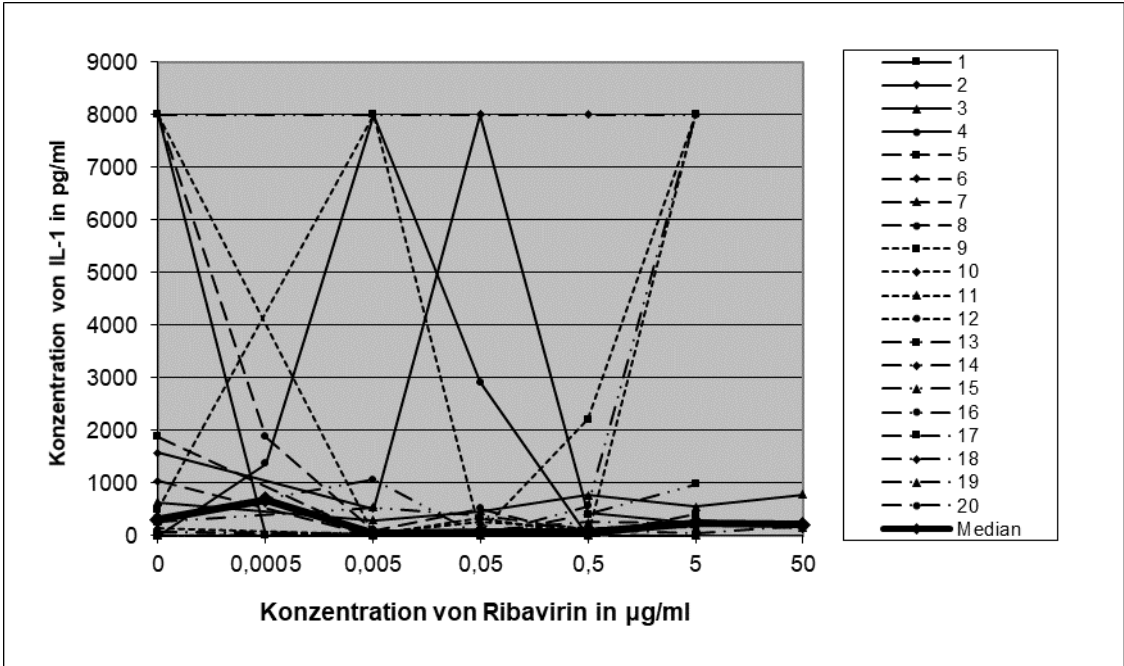
**Abbildung 52: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

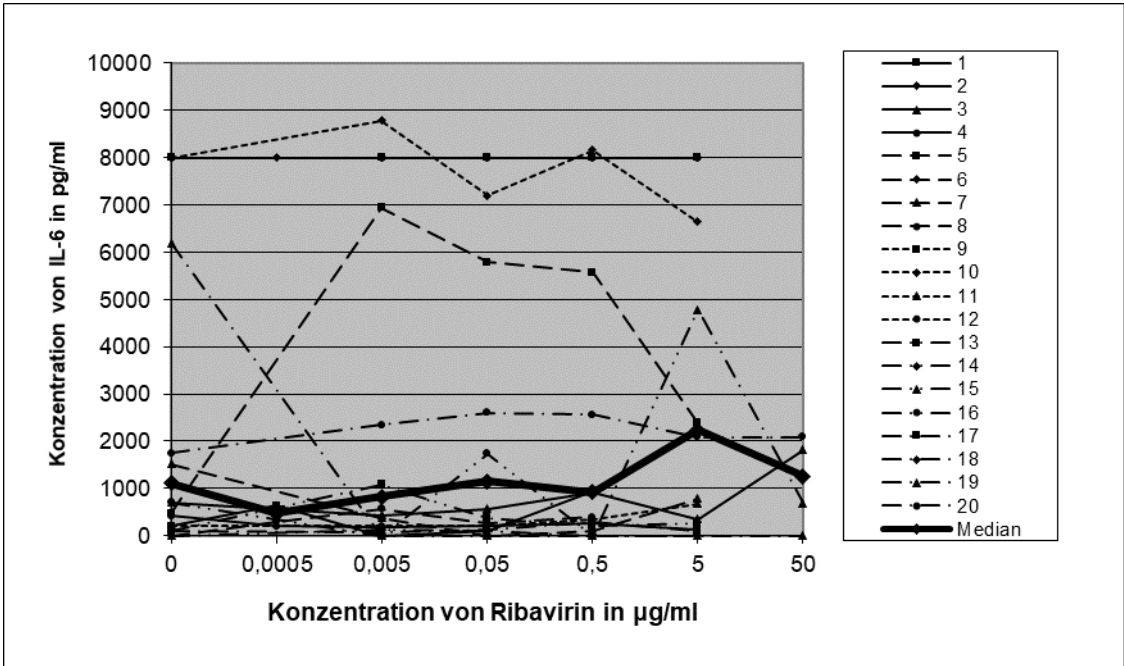


**Abbildung 53: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

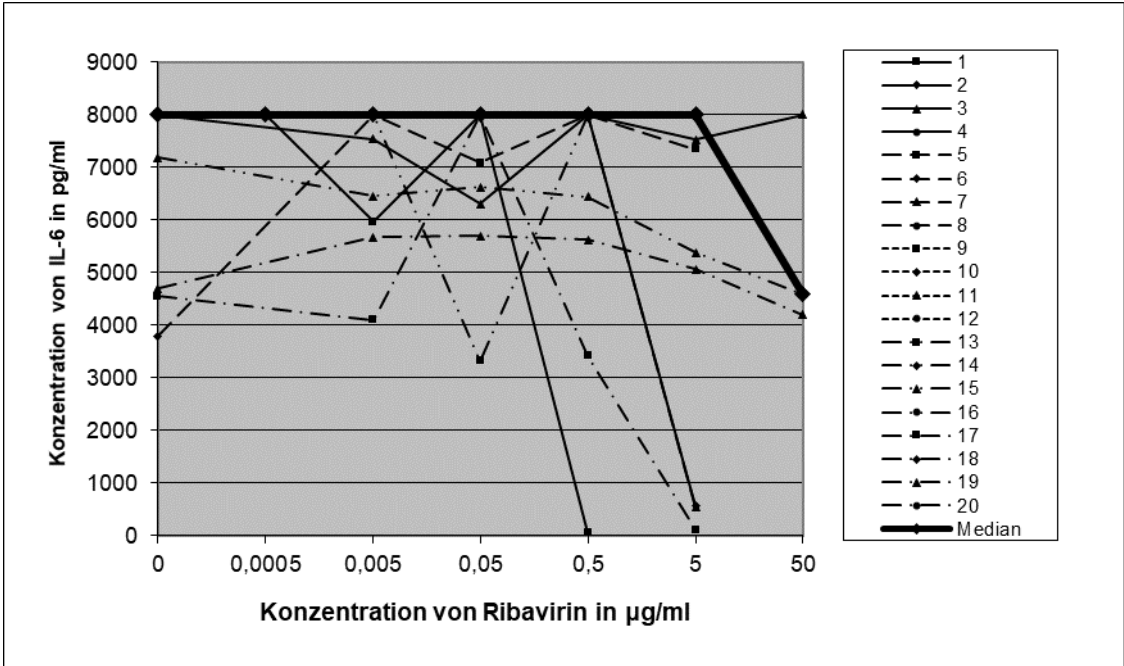


**Abbildung 54: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



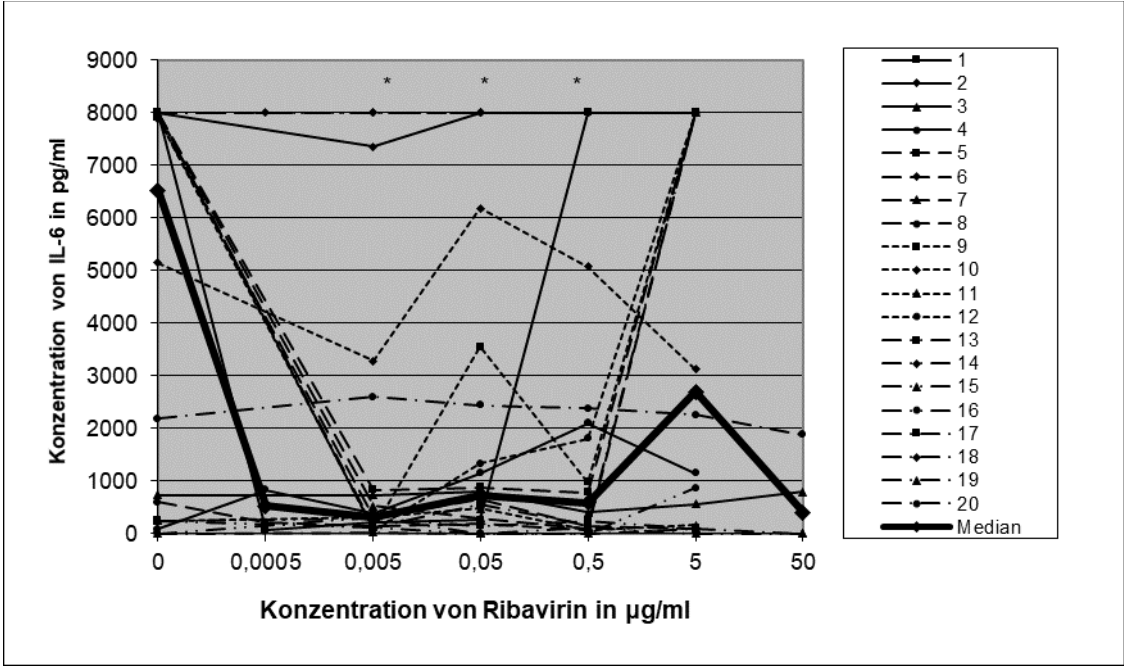
**Abbildung 55: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.





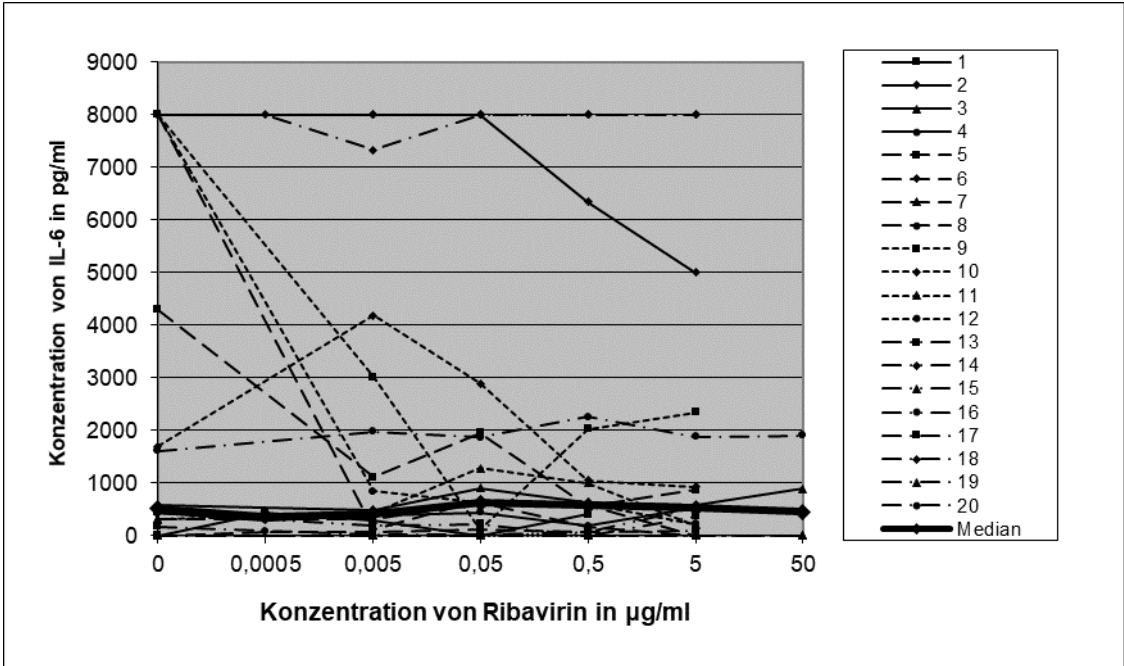
**Abbildung 56: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

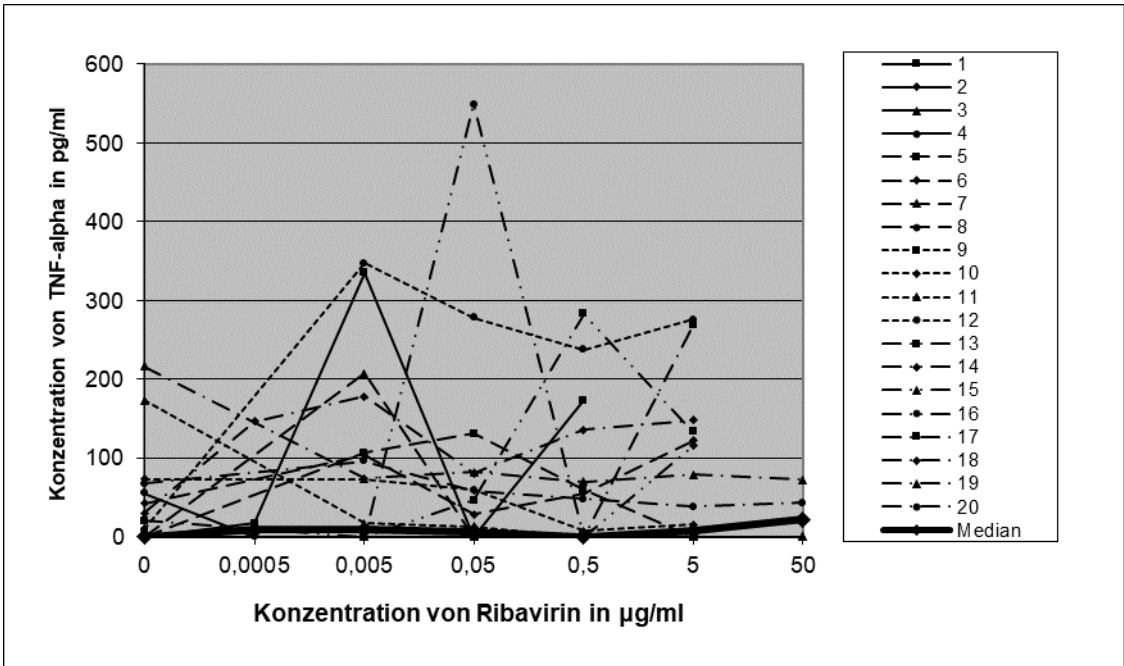


**Abbildung 57: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

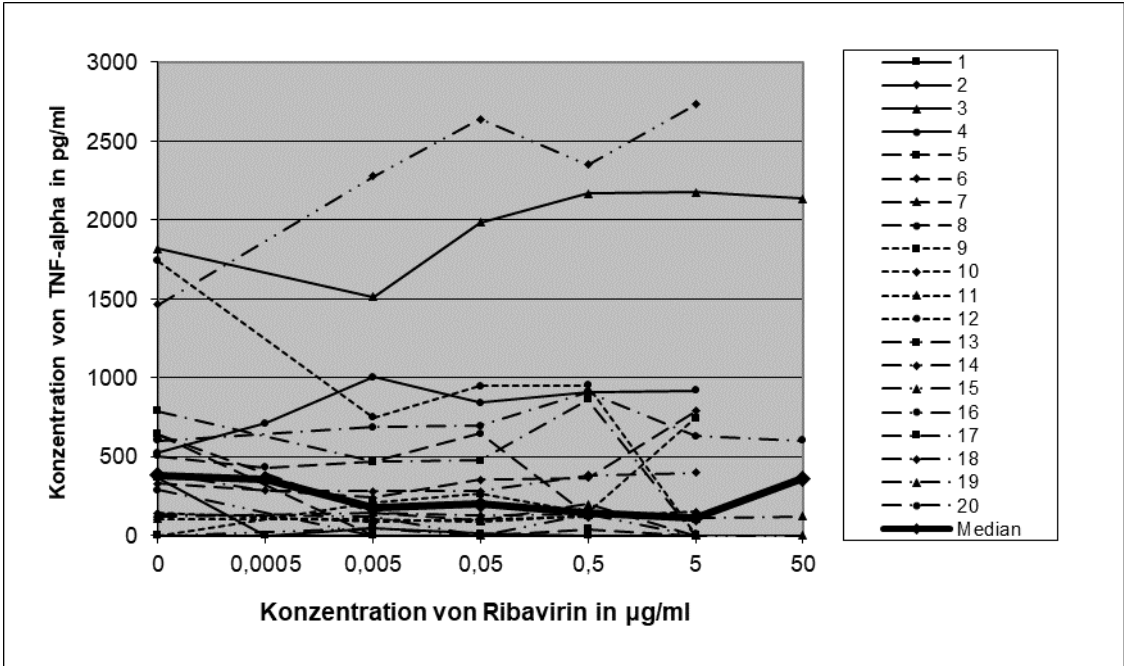
Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



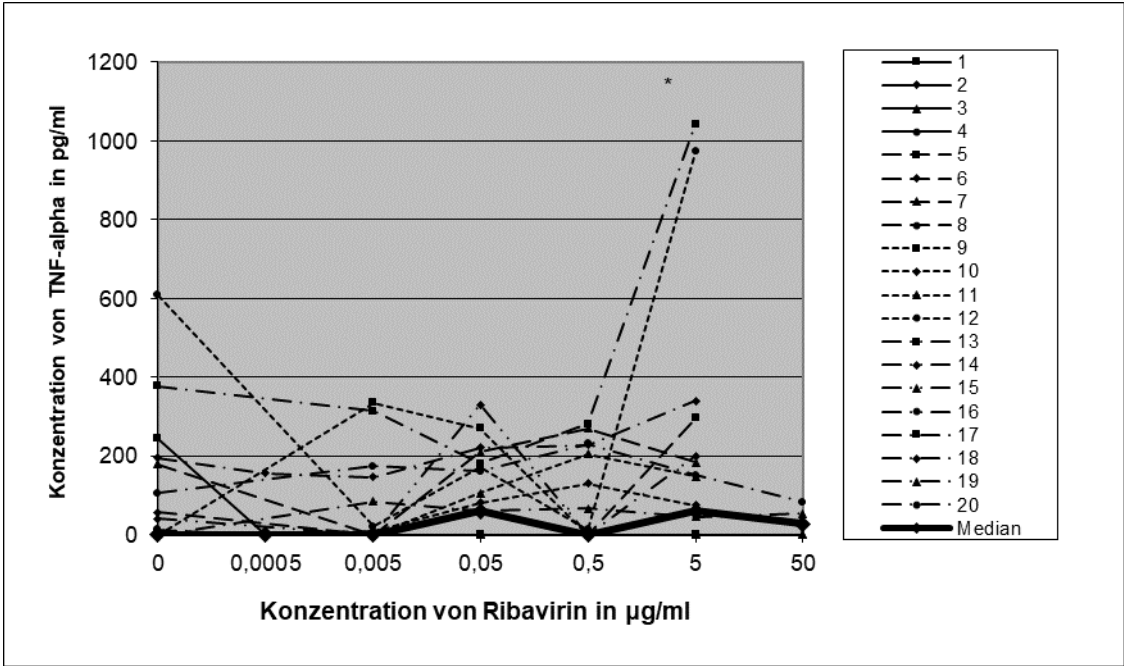
**Abbildung 58: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



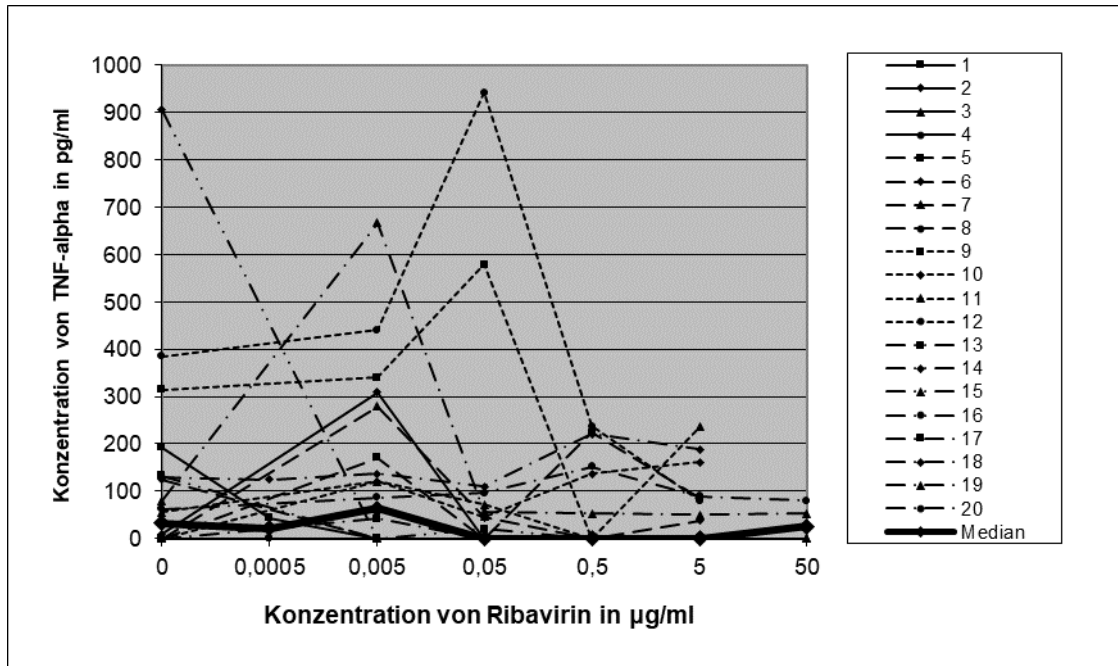
**Abbildung 59: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 60: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 61: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 62: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

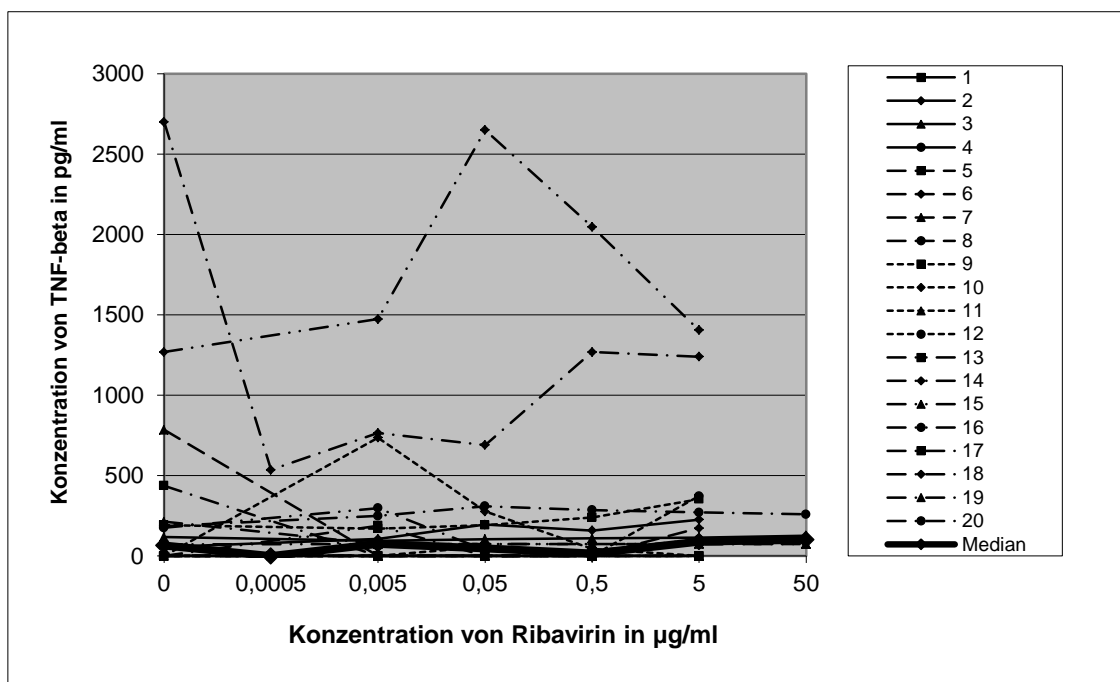
### 3.3.2 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion TH<sub>1</sub>-typischer Zytokine (TNF-β, IFN-γ) durch PBMC

In Abwesenheit von Ribavirin wurde die TNF-beta-Produktion (TNF-beta: 312 pg/ml) bei mehr als der Hälfte der Probanden nicht überschritten, ab dem der Nachweis als positiv gilt, was sich auch nach Zugabe von Ribavirin selten änderte (siehe Abbildungen 63 bis 66). Bis auf wenige Ausnahmen verliefen die Kurven der einzelnen Probanden ziemlich flach. Gleiches galt für die Mittelwertskurven, welche Werte zwischen 74 und 1411 pg/ml annahmen. Zu signifikanten Supprimierungen der TNF-beta-Produktion kam es nach Kostimulation mit BCG (5 µg/ml Konzentration), Tetanol und PPD (jeweils 0,5 µg/ml Konzentration) (siehe Abbildungen 64, 65 und 66). In den Lymphozytenüberständen der Probanden 14 und 18 wurden überdurchschnittlich hohe Werte mit und ohne Antigene gemessen.

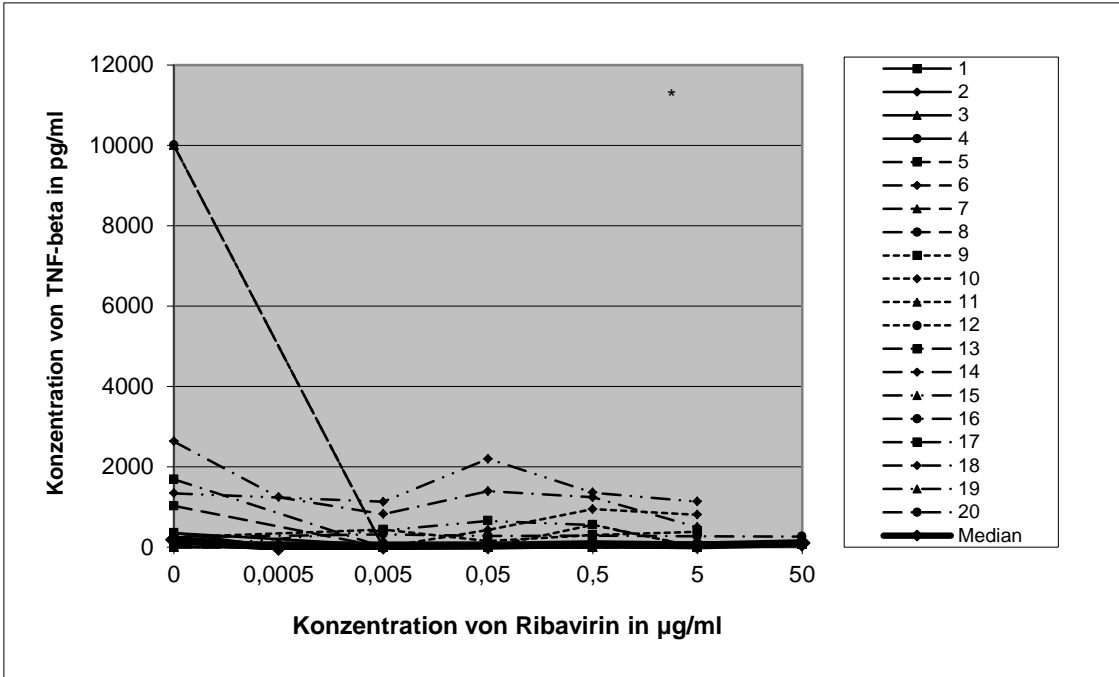
Ab einem Wert von 1250 pg/ml ist bei den IFN-gamma-Zytokinen von einer positiven Testreaktion auszugehen. Ohne Ribavirin und Zugabe eines Antigens reagierten die PBMC weniger Probanden positiv (siehe Abbildung 67), was sich

nach Zugabe von PPD, Tetanol und BCG zunehmend veränderte (siehe Abbildungen 68 bis 70 ). So bewirkte die Stimulation mit BCG, dass die PBMC von zwei Probanden negativ reagierten (siehe Abbildung 68). Die Mittelwertskurven von Ribavirin alleine und mit den Kostimulanzen Tetanol und PPD verliefen relativ flach und ohne große Ausschläge (siehe Abbildungen 67, 69 und 70), wohingegen die Kurve des Antigens BCG kontinuierlich abfiel (siehe Abbildung 68).

Ohne Kostimulus kam es bei der 5 µg/ml Konzentration von Ribavirin zu einer signifikanten Supprimierung der IFN-gamma-Zytokine (siehe Abbildung 67). Ebenso wurden die Zytokine nach Kostimulation mit Ribavirin und Tetanol bei der Konzentration 0,005 und 5 µg/ml inhibiert (siehe Abbildung 69). Wieder fiel bei zwei Probanden auf, dass ihre PBMC überdurchschnittlich hohe Messwerte mit und ohne Antigene hatten (Probanden 9 und 12).

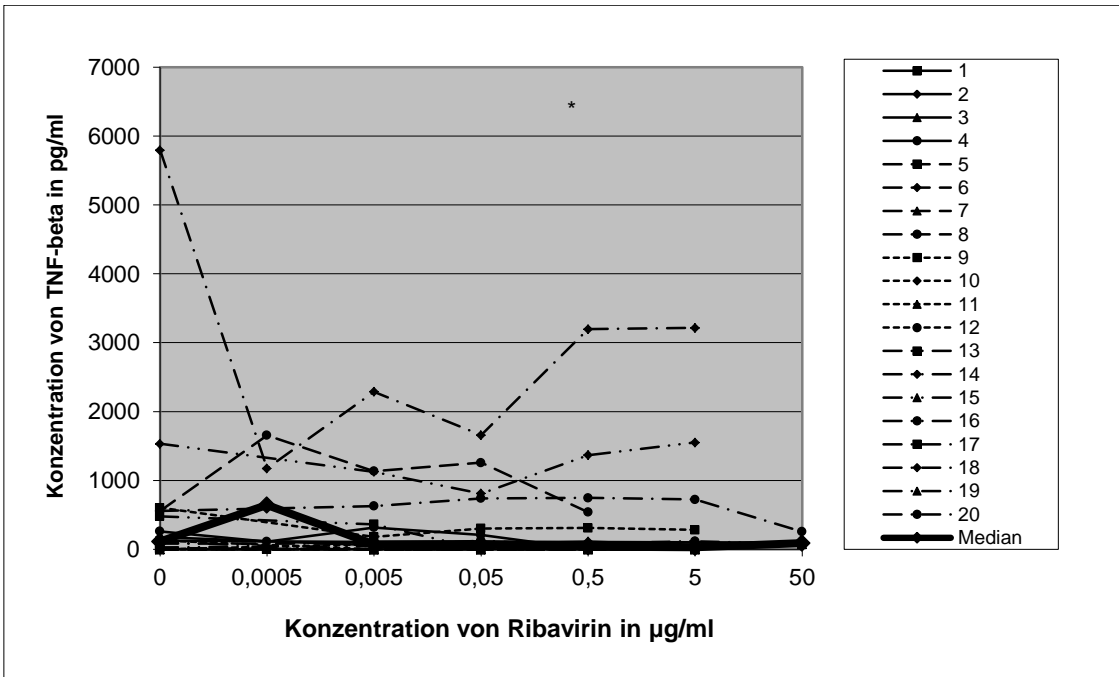


**Abbildung 63: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



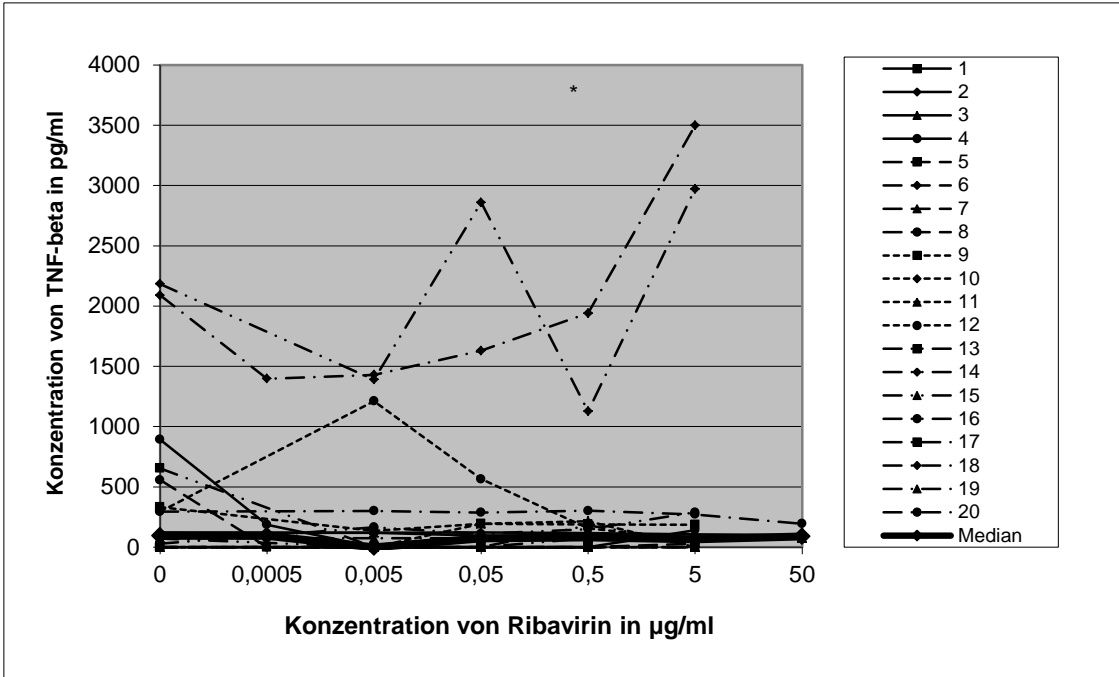
**Abbildung 64: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



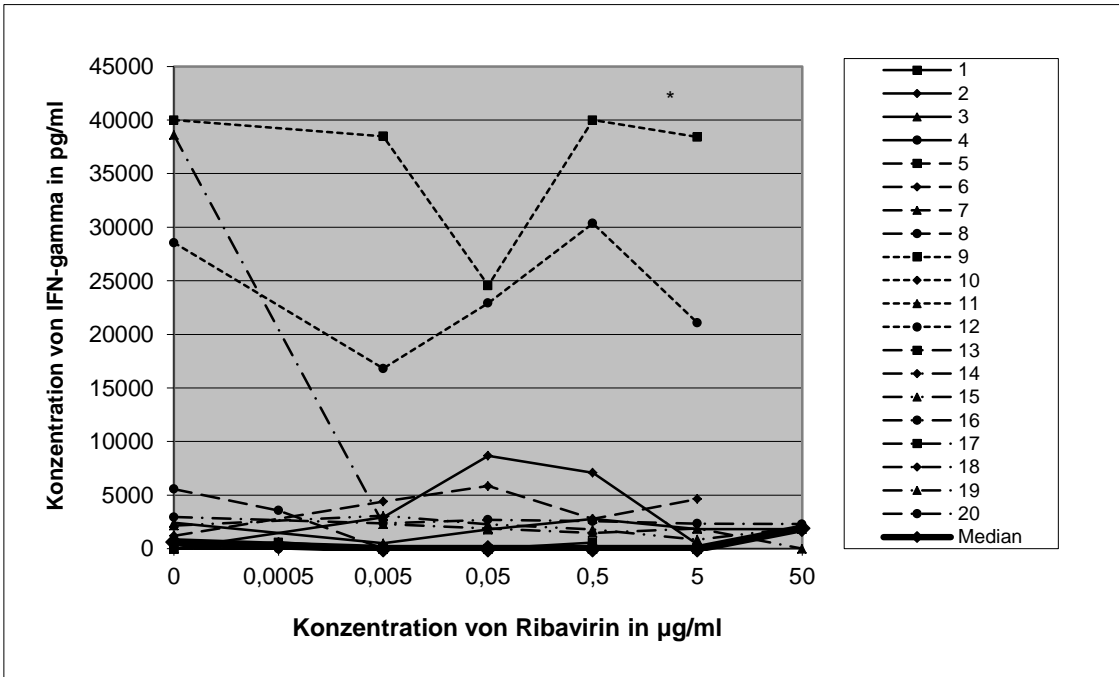
**Abbildung 65: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



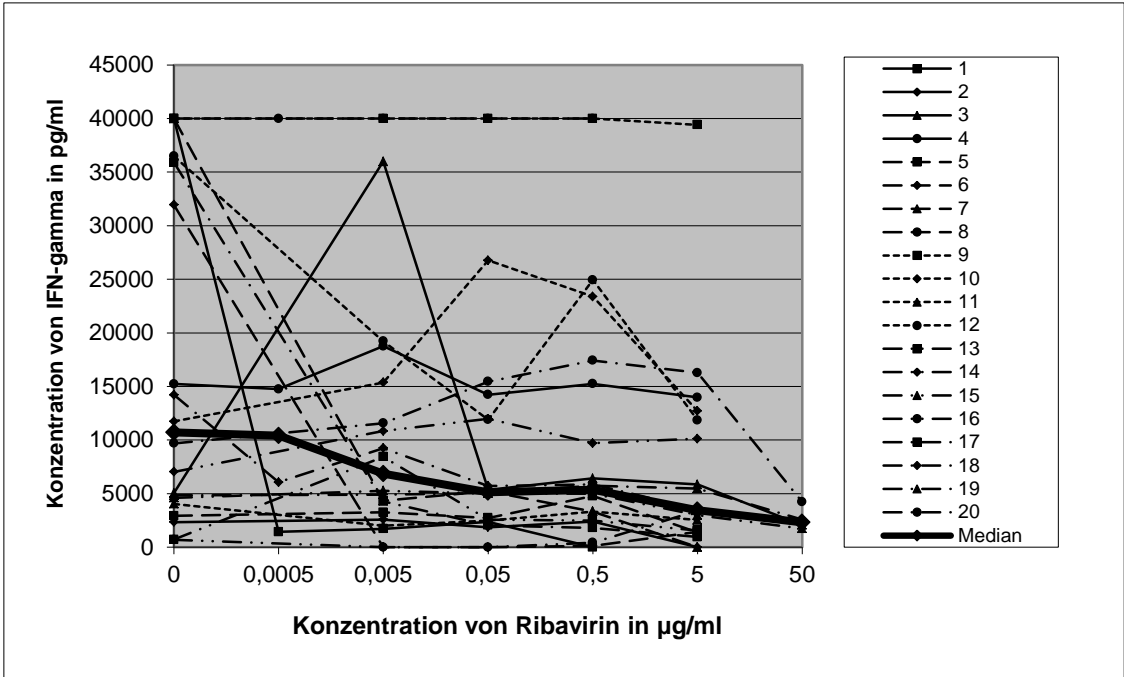
**Abbildung 66: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

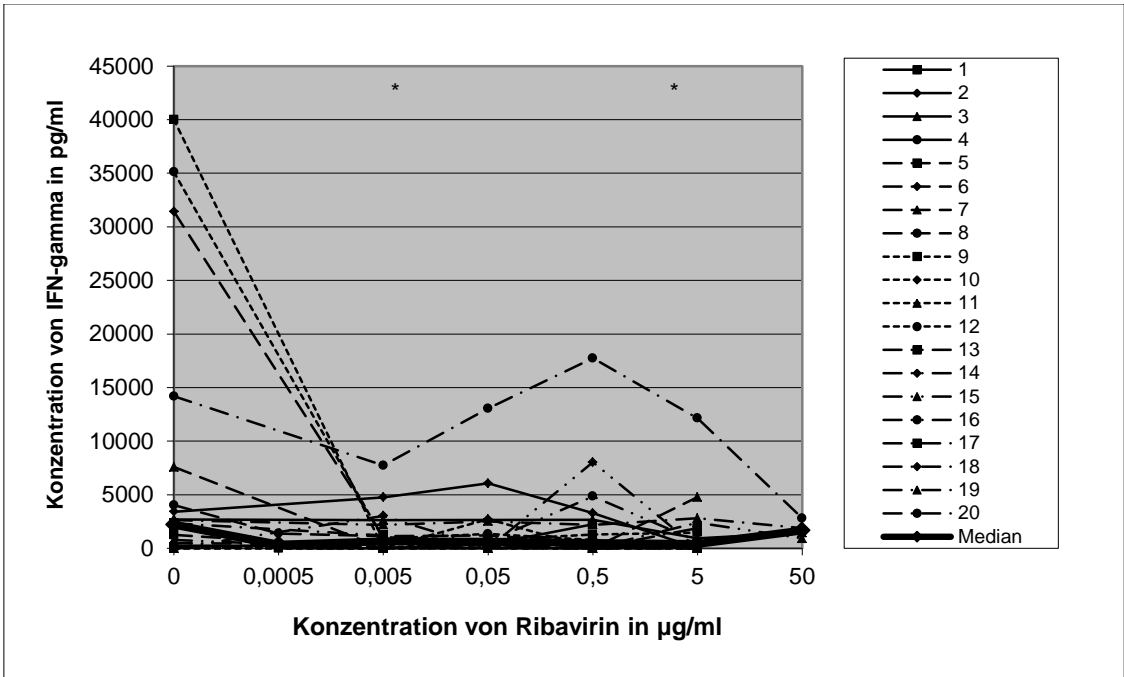


**Abbildung 67: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

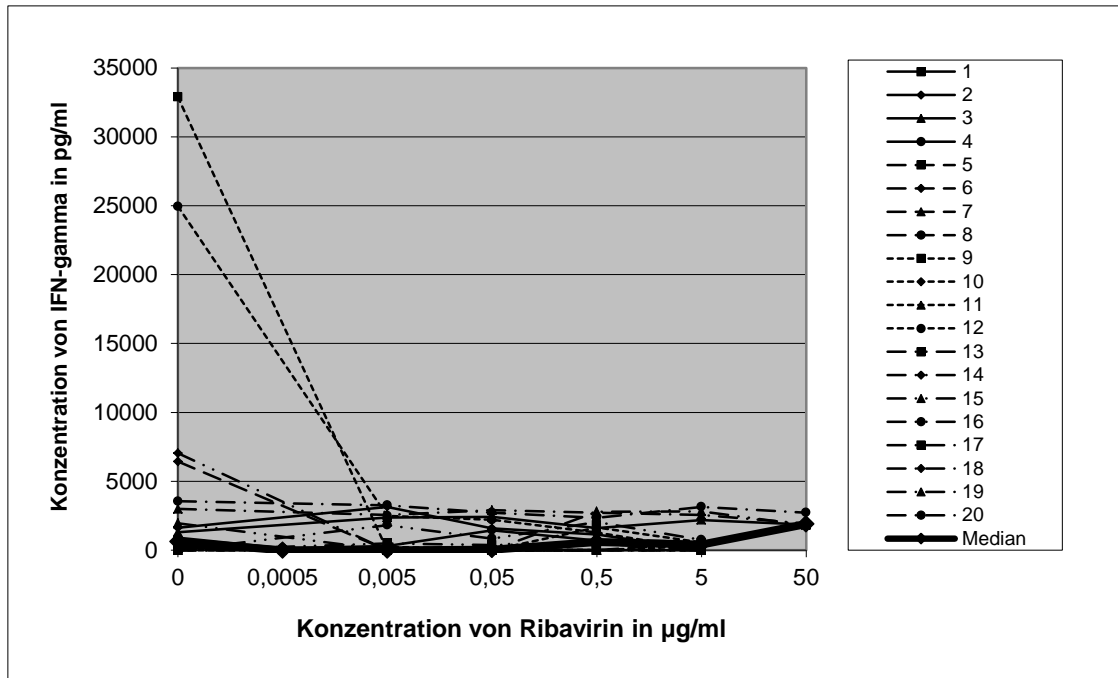


**Abbildung 68: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 69: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



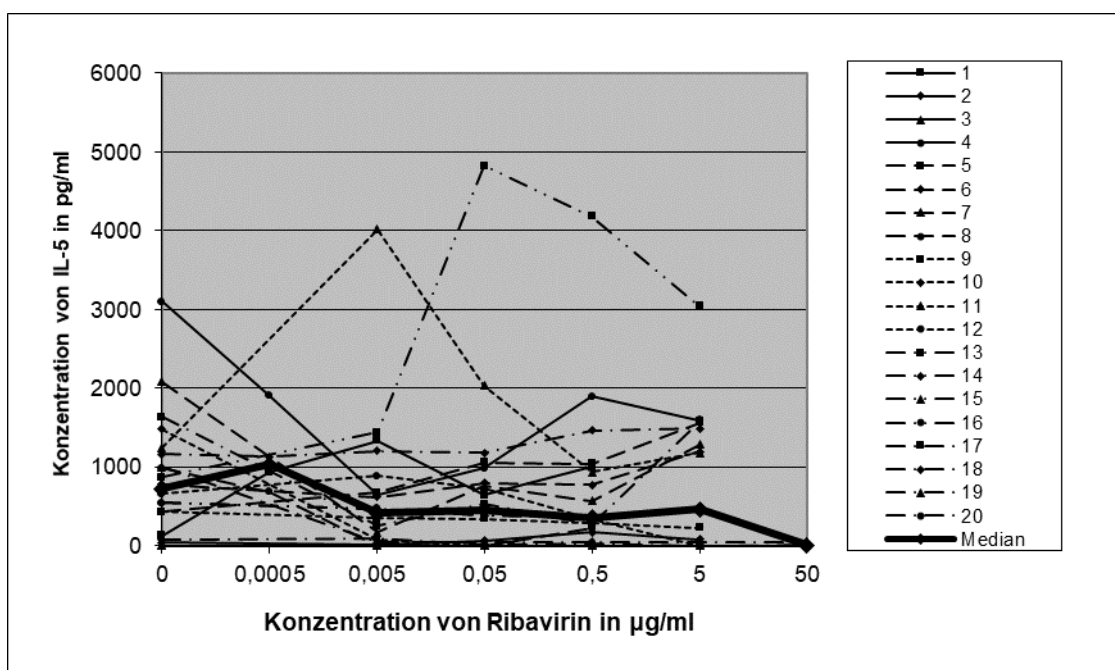


**Abbildung 70: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.3.3 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion TH<sub>2</sub>-typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC

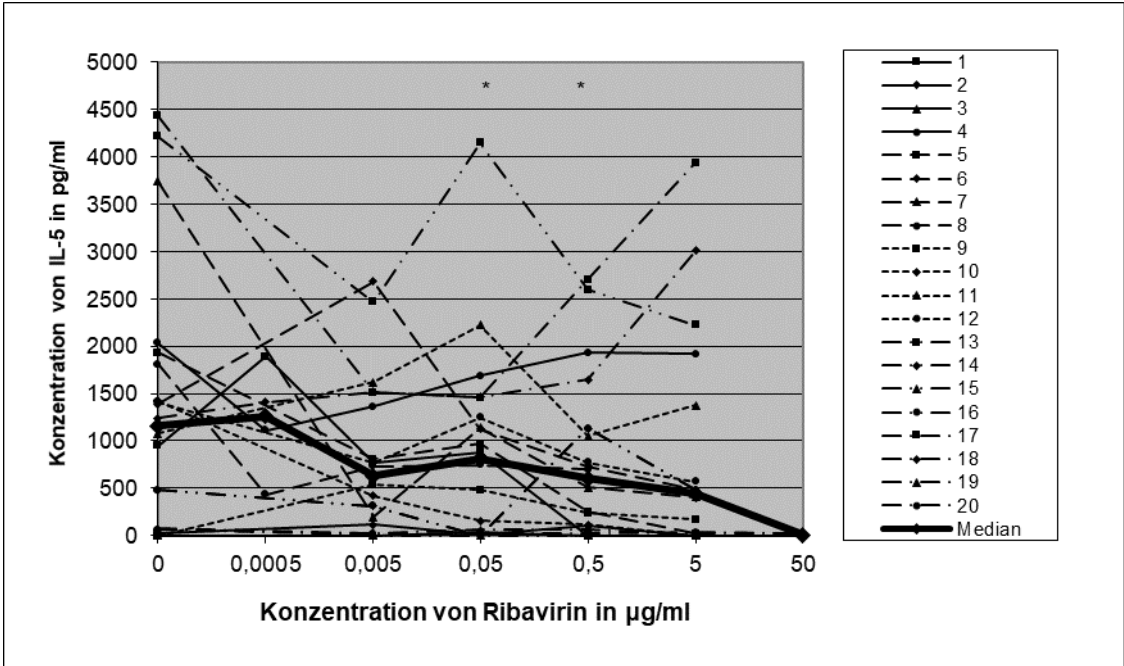
Der Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-5 als positiv gilt, ist 470 pg/ml und wurde ohne Stimulierung durch ein Antigen und ohne Zugabe von Ribavirin von den PBMC bei gut der Hälfte der Probanden erreicht (siehe Abbildung 71). Die PBMC von zwei der „Non-Responder“ überschritten nach Zugabe von Ribavirin den Grenzwert. Nach alleiniger Stimulation mit den Antigenen erreichten bei BCG- und PDD-Stimulierung die PBMC von sechs (siehe Abbildungen 72 und 74) und bei Tetanol von vier Probanden nicht den Grenzwert (siehe Abbildung 73). Nach Zugabe von Ribavirin reagierten die PBMC bei zwei der „Non-Responder“ bei Tetanol positiv, bei BCG und PPD jeweils bei einem Probanden. Der höchste Messwert wurde mit 15000 pg/ml bei der Stimulierung mit PPD gemessen (siehe Abbildung 74). Durchschnittlich die höchsten IL-5-Spiegel wurden bei der niedrigsten Konzentrationsstufe von Ribavirin gemessen. Danach kam es zu einem Abfall der Mediankurven. Die Kostimulation mit BCG bewirkte eine signifikante Inhibierung in der 0,05 und

0,5 µg/ml Konzentration von Ribavirin (siehe Abbildung 72). Beim Antigen Tetanol wurden die IL-5-Zytokine in der niedrigsten Konzentrierung von Ribavirin aktiviert und in der 5 µg/ml Konzentration inhibiert (siehe Abbildung 73). Bei den IL-13-Zytokinen überschritten die PBMC der Mehrzahl der Probanden den Grenzwert von 283 pg/ml bei der Messung ohne Ribavirin (siehe Abbildungen 75 bis 78). Die meisten „Non-Responder“ gab es bei den Antigenen Tetanol und PPD (jeweils sechs Probanden, siehe Abbildungen 77 und 78). Nach Zugabe von Ribavirin reagierte im Schnitt die Hälfte der PBMC der „Non-Responder“ positiv. Bei einigen Probanden zeigten sich überdurchschnittlich hohe Messwerte (z. B. Proband 2, 5, 12, 14 und 18). Nach Stimulierung der Zellen mit Ribavirin alleine kam es bei den Verdünnungen 0,005 und 0,5 µg/ml zu einer signifikanten Supprimierung (siehe Abbildung 75). Zudem wurde die IL-13-Produktion bei Kostimulation mit BCG bei den Verdünnungen 0,005, 0,5 und 5 µg/ml (siehe Abbildung 76) und bei der Kostimulation mit Tetanol bei 0,5 und 5 µg/ml signifikant inhibiert (siehe Abbildung 77).



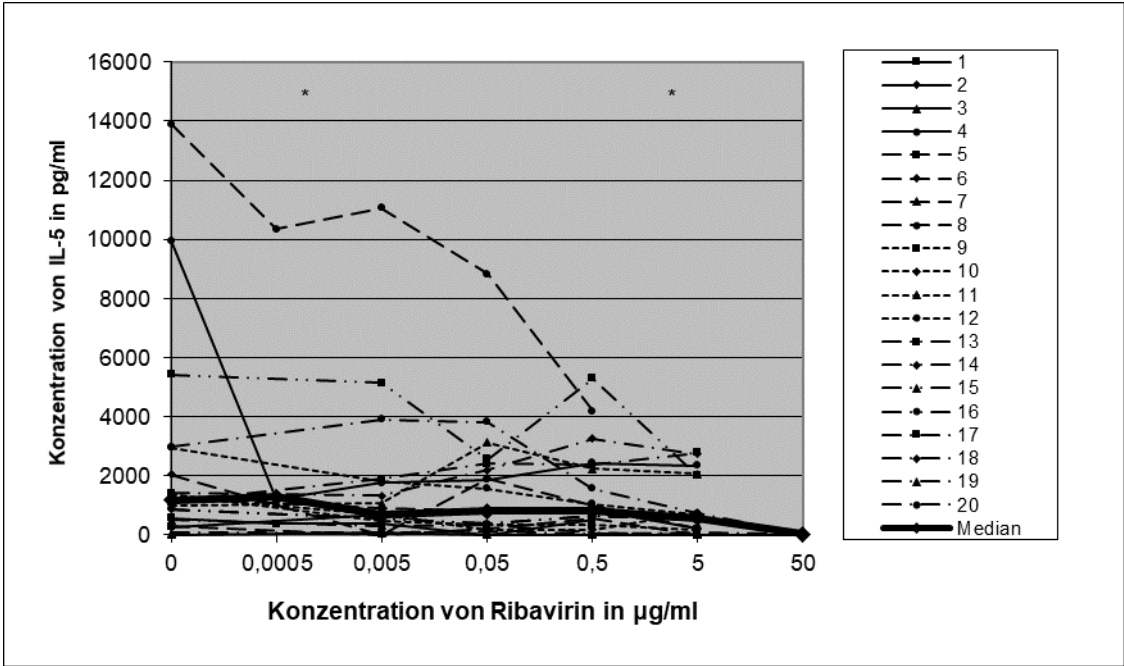
**Abbildung 71: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



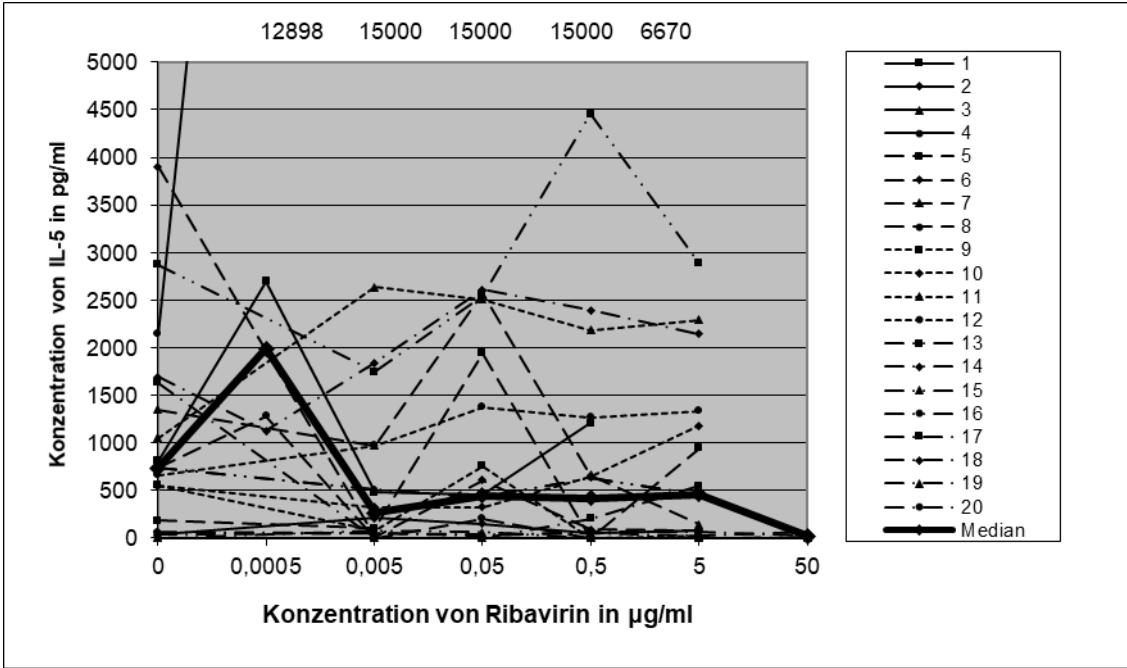
**Abbildung 72: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

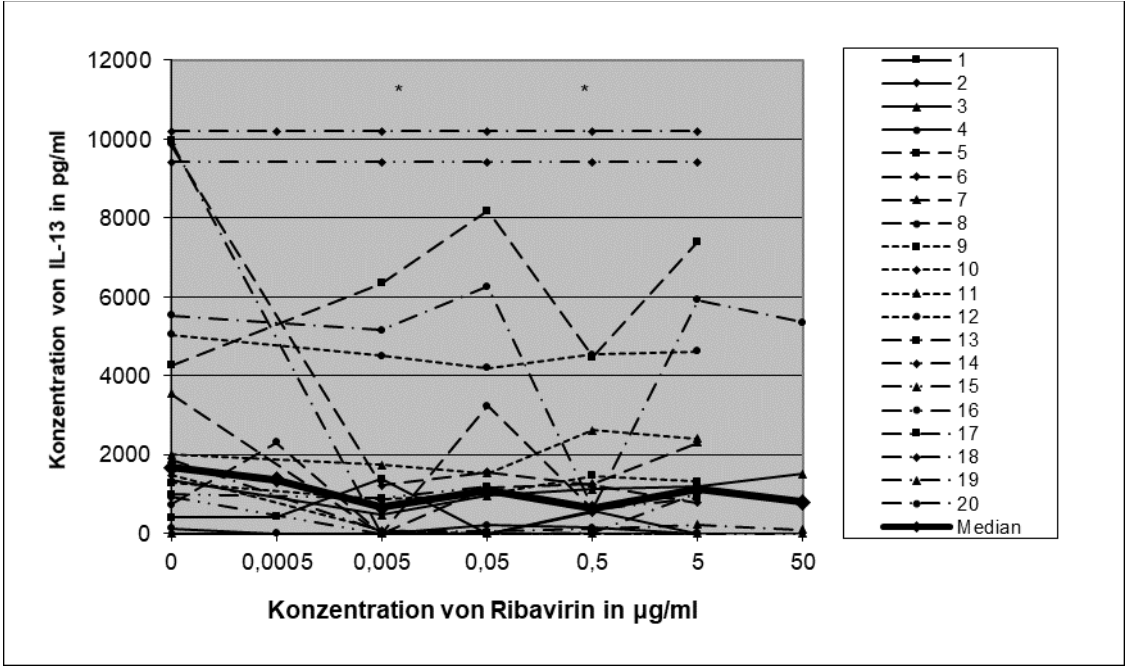


**Abbildung 73: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

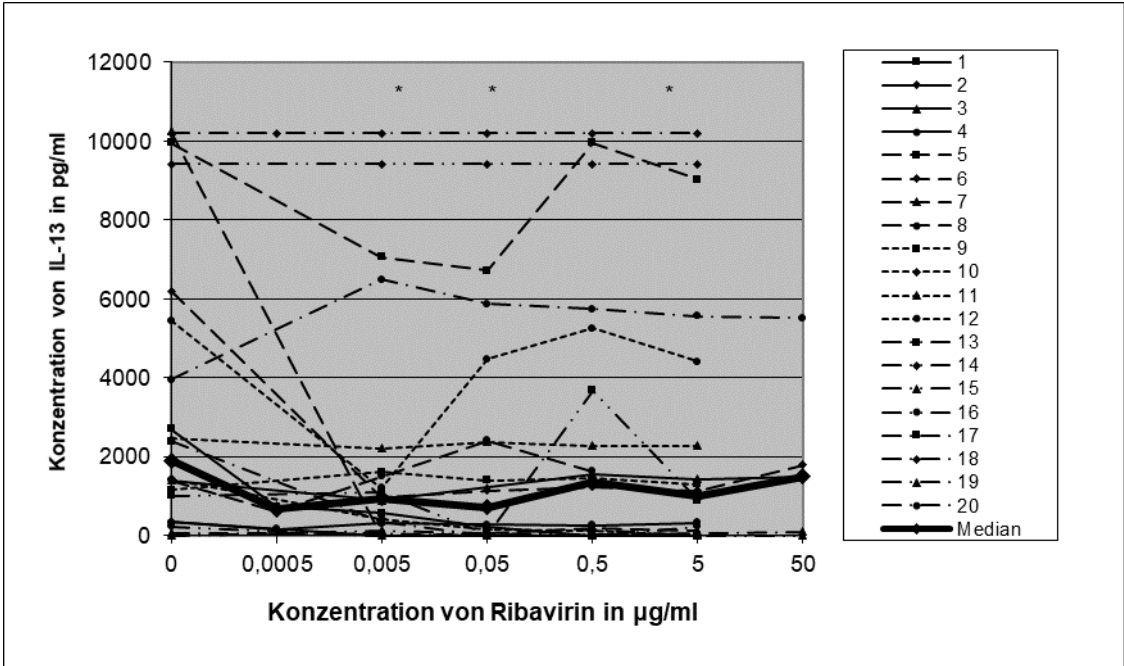
Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 74: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

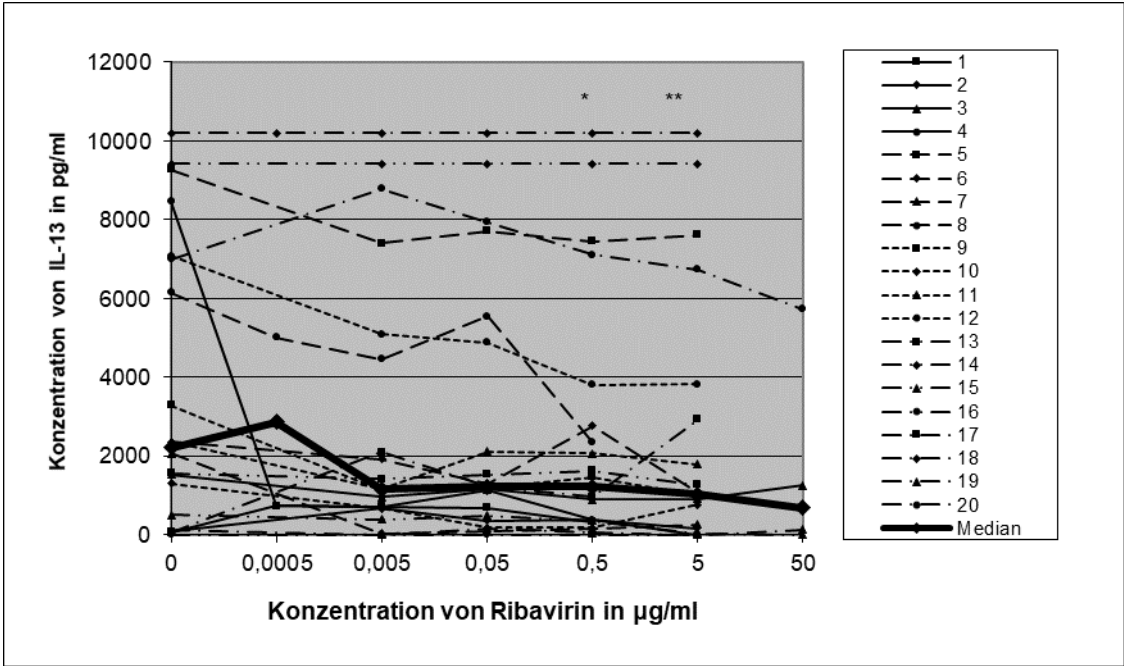


**Abbildung 75: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



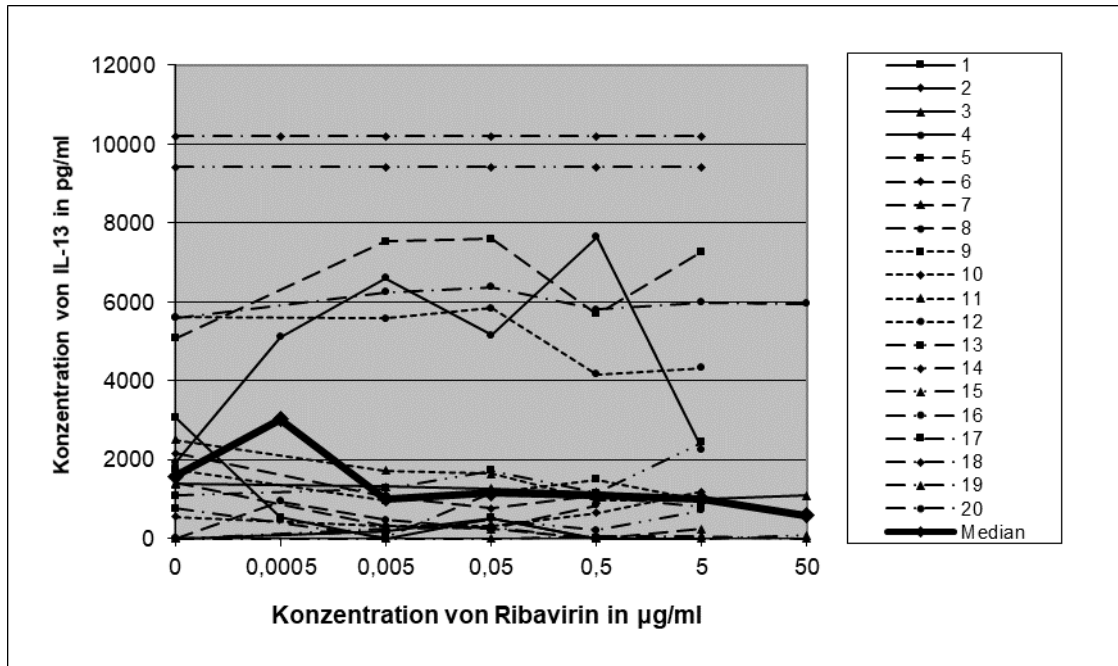
**Abbildung 76: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 77: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

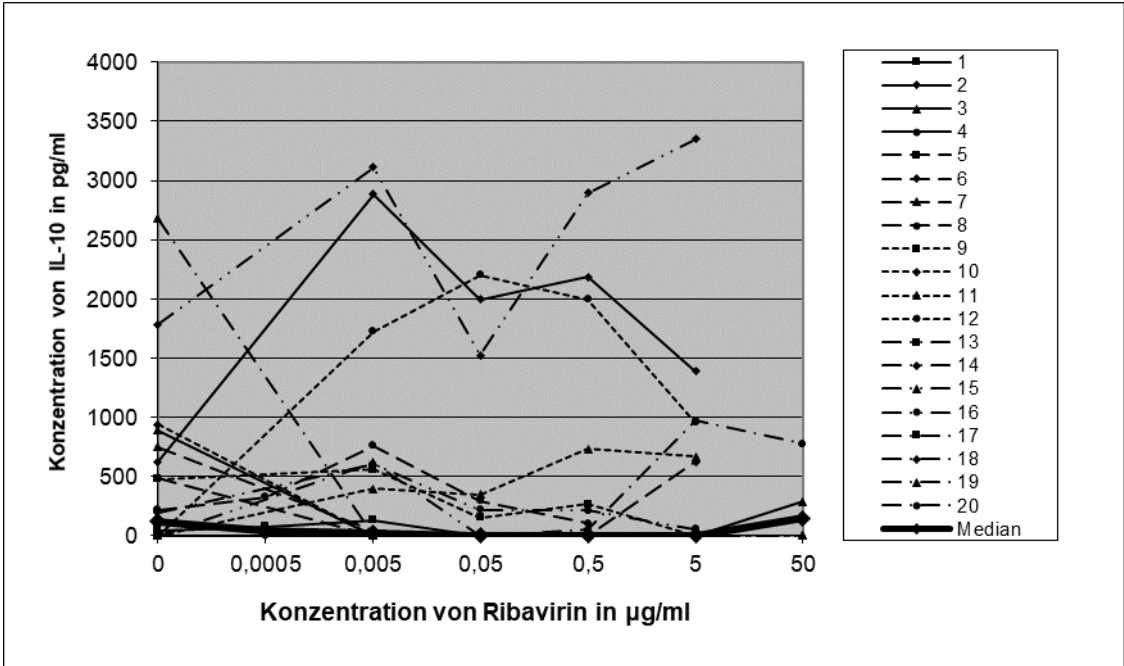


**Abbildung 78: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

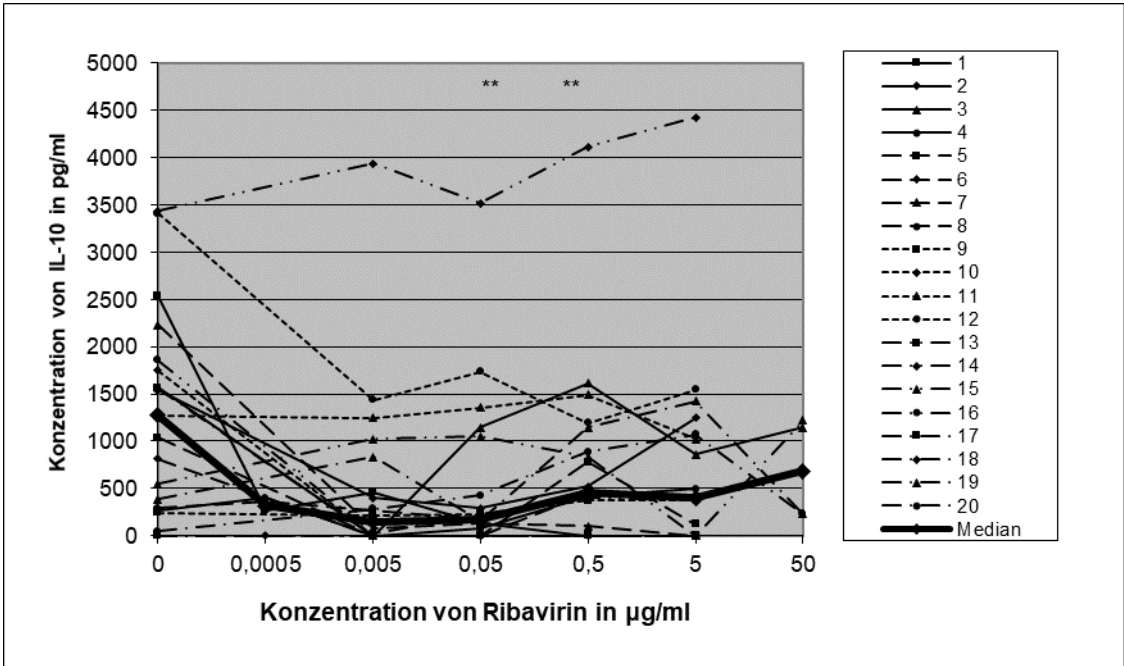
### 3.3.4 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion regulatorischer T-Zellen-typischer Zytokine (IL-10) durch PBMC

Bei der Hälfte der Probanden exprimierten die PBMC ohne Kostimulanzen (siehe Abbildung 79) und bei Kostimulation mit Tetanol ohne Ribavirin IL-10 (Grenzwert für IL-10: 156 pg/ml) (siehe Abbildung 81). Die Stimulation mit PPD ohne Ribavirin führte lediglich zu fünf „Respondern“ (siehe Abbildung 82) und die Stimulation mit BCG ohne Ribavirin zu 18 „Respondern“ (siehe Abbildung 80). Durch die Zugabe von Ribavirin kam es bei den Lymphozytenüberständen vieler „Non-Responder“ zu einer Zunahme der Messwerte, sodass der Grenzwert überschritten wurde.

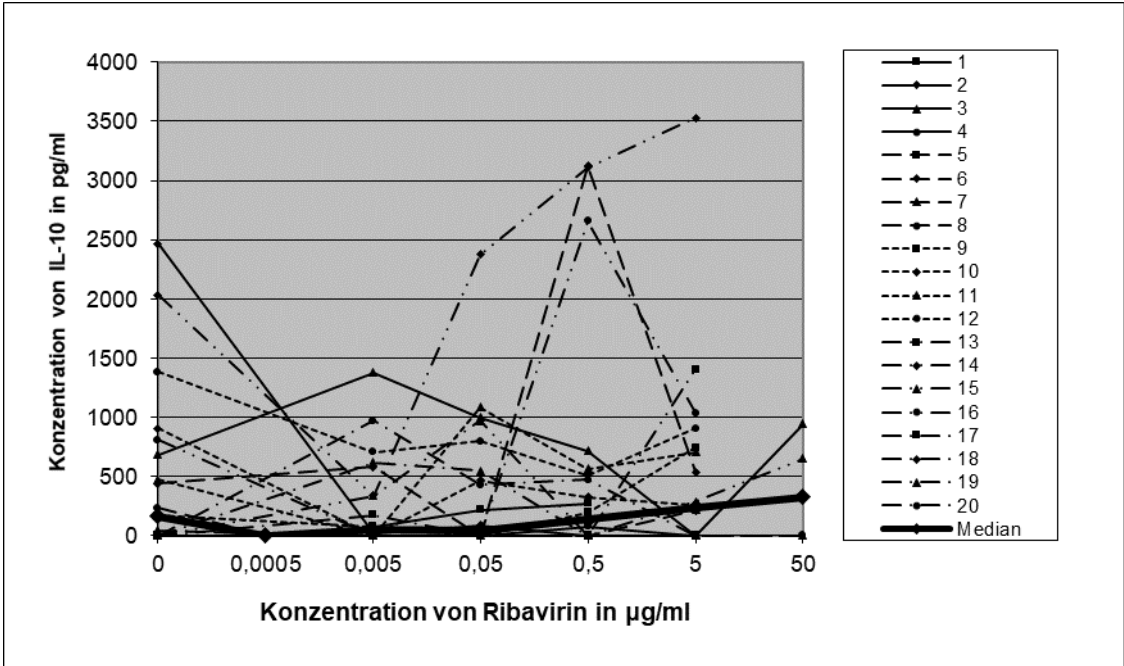
Die Mediankurven verliefen insgesamt eher flach. Bei Kostimulation von Ribavirin mit BCG kam es zu einer signifikanten Inhibierung der IL-10-Zytokine bei den Konzentrationen 0,005 und 0,05 µg/ml (siehe Abbildung 80).



**Abbildung 79: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

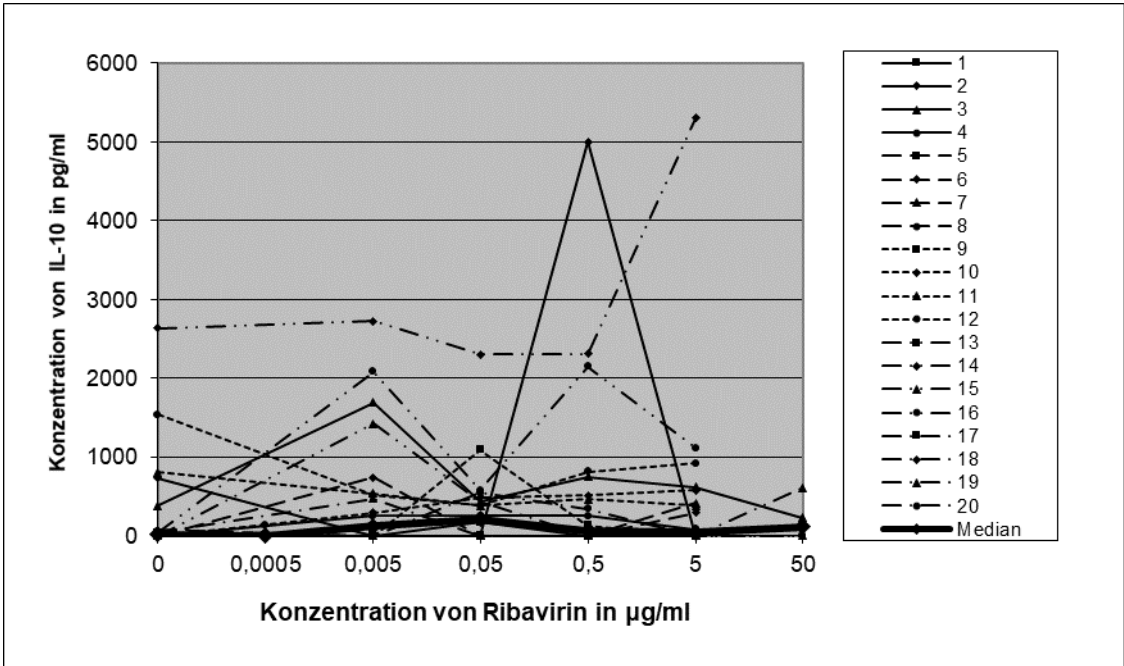


**Abbildung 80: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 81: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



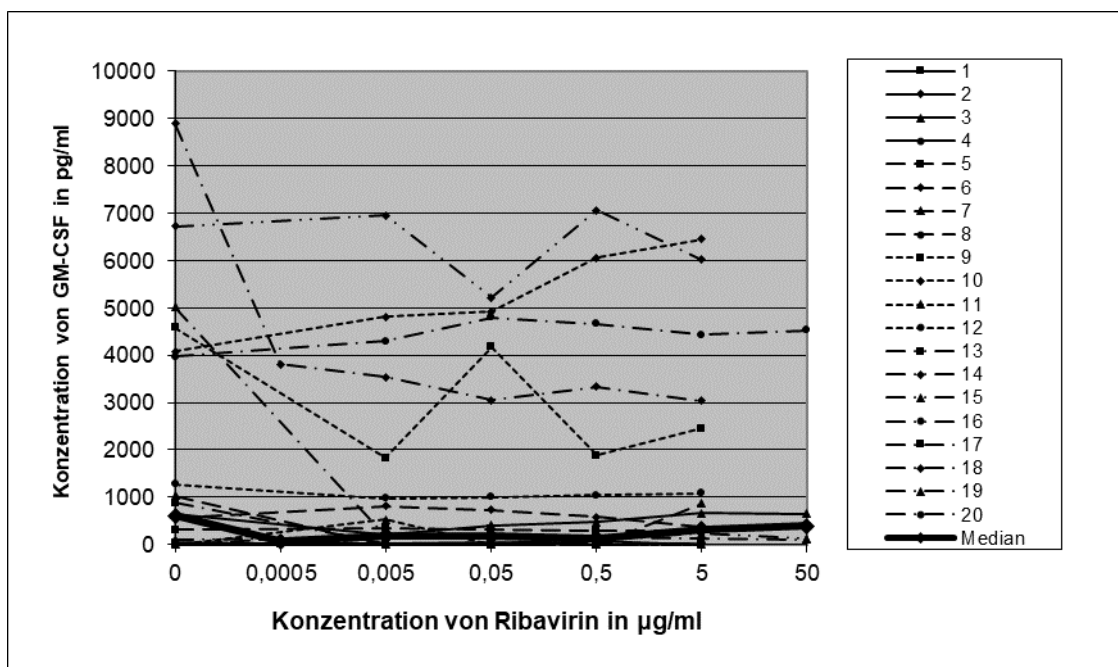
**Abbildung 82: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

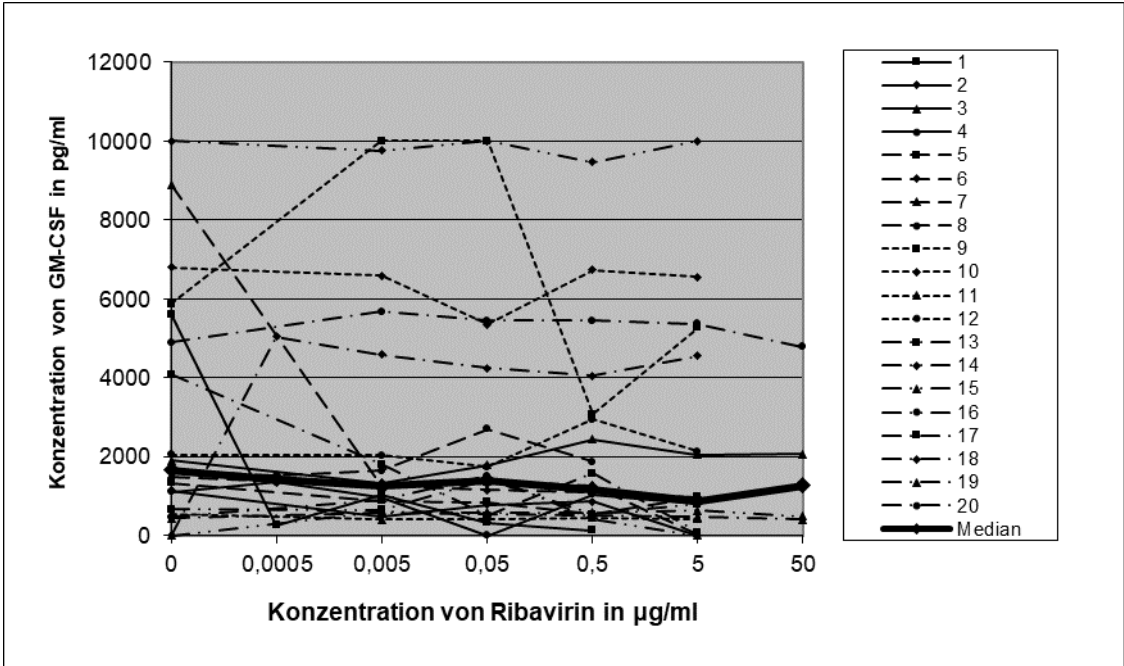


### 3.3.5 Einfluss von Ribavirin auf die Produktion allgemeiner T-Zellmarker (GM-CSF) durch PBMC

Ohne Ribavirin kam es ohne Kostimulation (Abbildung 83) und bei Kostimulation mit PPD (siehe Abbildung 86) bei den PBMC von acht der Probanden zum Überschreiten des Grenzwertes von 312 pg/ml, ab dem der Nachweis von GM-CSF als positiv gilt. Bei Kostimulation mit BCG waren es die PBMC eines Probanden (siehe Abbildung 84) und bei Kostimulation mit Tetanol die PBMC dreier Probanden (siehe Abbildung 85). Durch Zugabe von Ribavirin reagierten ohne Kostimulator und bei Kostimulation mit BCG bzw. Tetanol die PBMC eines „Non-Responders“ positiv, bei Kostimulation mit PPD reagierten die PBMC von zwei Probanden positiv. Die höchste Mediankurve entstand bei Kostimulation mit BCG mit Werten bis 1398 pg/ml (siehe Abbildung 84). Bei der 5 µg/ml Konzentration von Ribavirin kam es sowohl bei Kostimulation von Ribavirin mit BCG (siehe Abbildung 84) als auch mit PPD (siehe Abbildung 86) zu einer signifikanten Inhibierung der GM-CSF-Produktion.

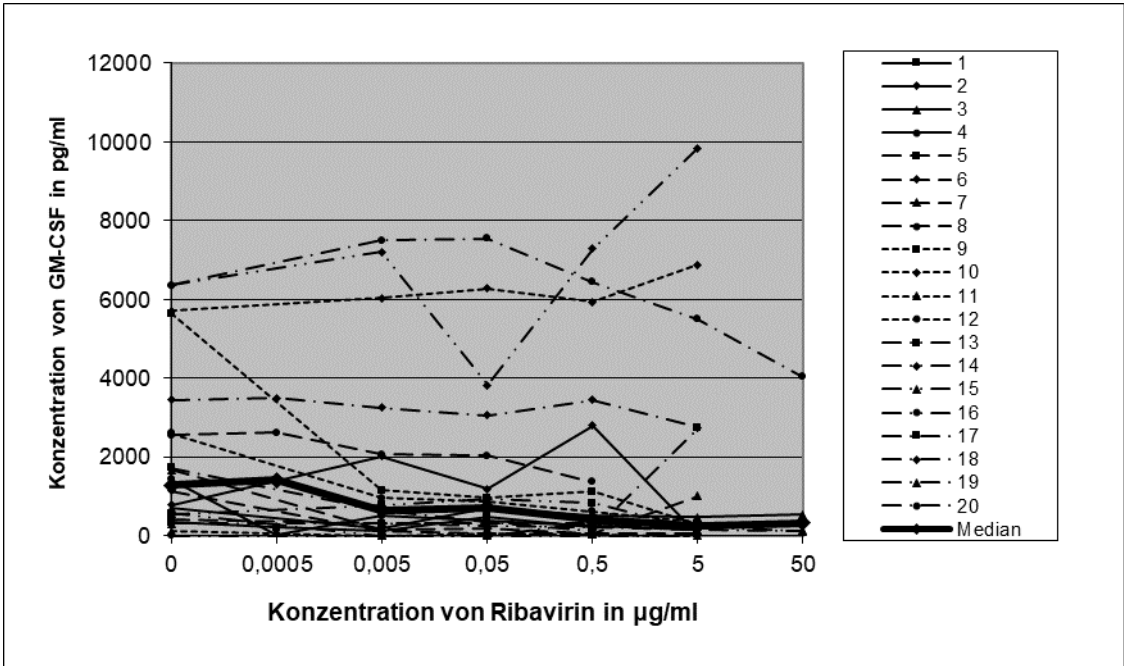


**Abbildung 83: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



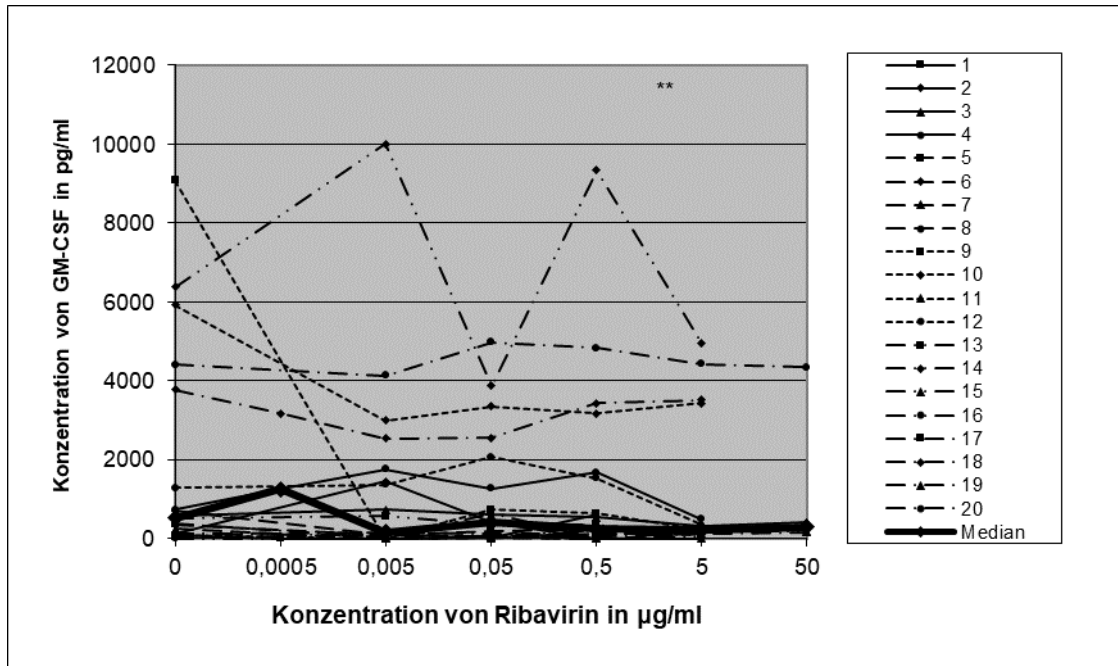
**Abbildung 84: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 85: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 86: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Ribavirin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.

### 3.3.6 Einfluss von Amantadin auf die Produktion Makrophagen-typischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch PBMC

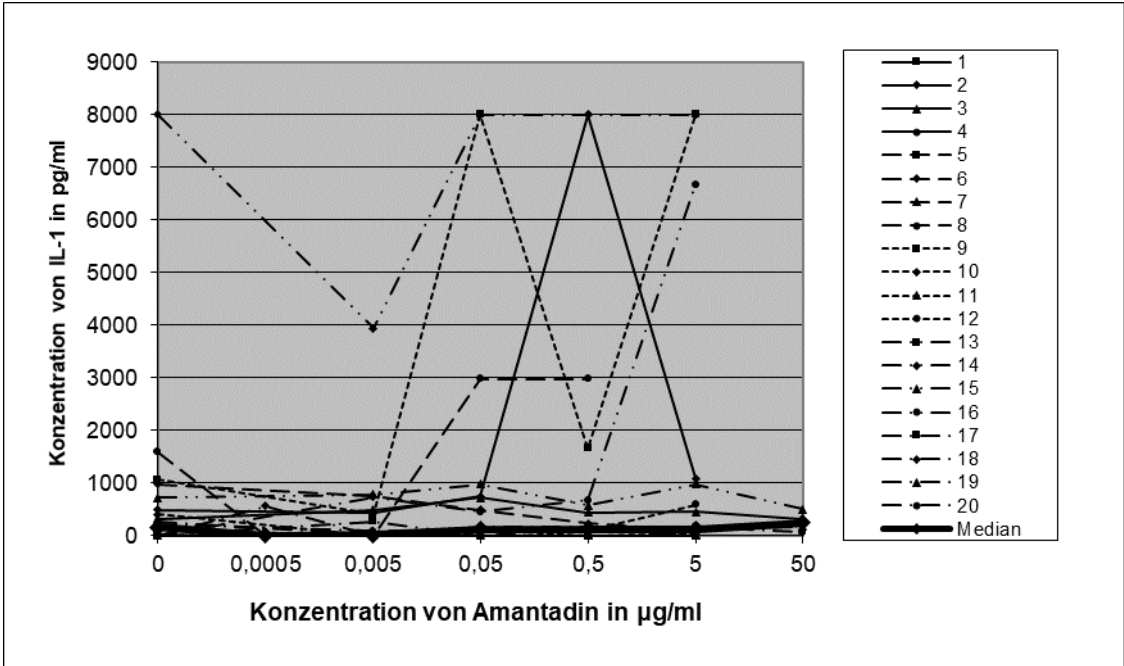
Bei den folgenden Tests (Kapitel 3.3.6 bis 3.3.10) entsprechen die Messwerte der Zytokine bei alleiniger Stimulation mit den Antigenen ohne Amantadin den Messwerten der Zytokine bei alleiniger Stimulation mit den Antigenen ohne Ribavirin und es wird freundlicherweise auf den Text der Kapitel 3.3.1 bis 3.3.5 verwiesen.

In Abwesenheit von Amantadin und den Antigenen kam es bei den PBMC von elf Probanden zu keinem Überschreiten des Grenzwertes, ab dem der Nachweis von IL-1 als positiv gilt (IL-1: 250 pg/ml) (siehe Abbildung 87). Nach Zugabe von Amantadin reagierten die Lymphozytenüberstände von vier der „Non-Responder“ positiv. Nach Zugabe von Amantadin zu den Zytokinen kam es bei den PBMC von jeweils zwei der „Non-Responder“ bei BCG und PPD zu einem Anstieg der Messwerte über den Grenzwert (siehe Abbildungen 88 und 90) und bei den PBMC von drei der „Non-Responder“ bei Stimulation mit Tetanol (siehe Abbildung 89). Die Mediankurven verliefen insgesamt eher flach.

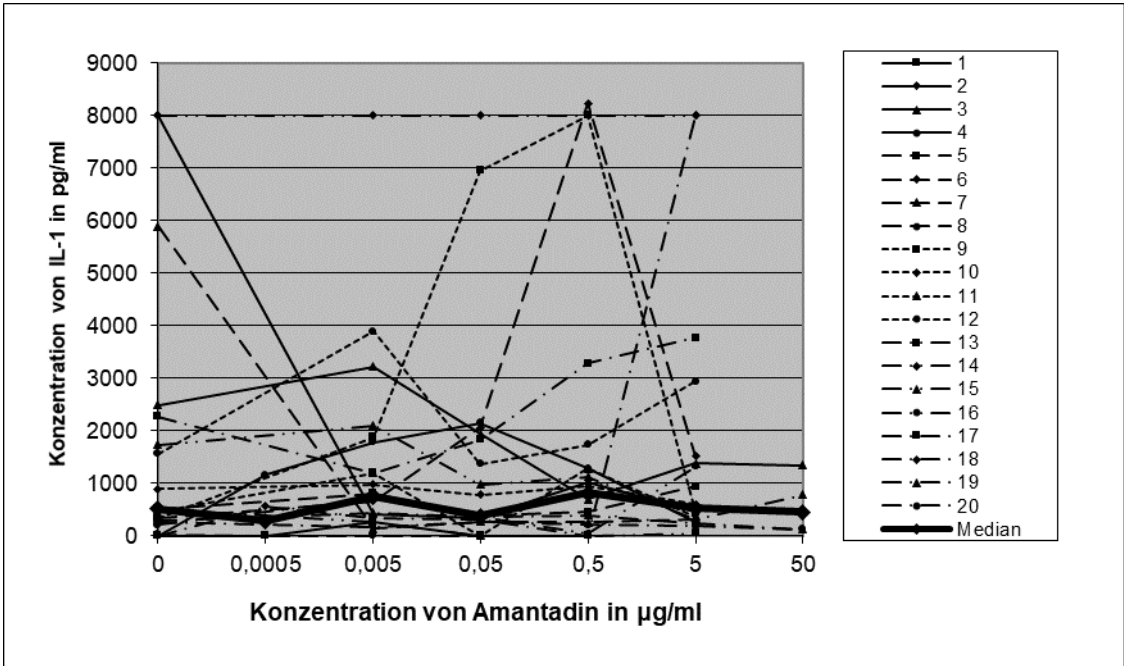
Die höchsten Werte wurden im Median nach Kostimulation mit Tetanol erreicht. U. a. die PBMC der Probanden 9 und 14 hatten überdurchschnittlich hohe Messwerte. Nach Kostimulation mit Amantadin und Tetanol kam es im mittleren Verdünnungsbereich (0,5 µg/ml) zu einer signifikanten Inhibierung der IL-1-Produktion (siehe Abbildung 89).

Ohne Amantadin- und Antigenbeigabe erreichten die PBMC von sechs Probanden den Grenzwert von 250 pg/ml, ab dem der Nachweis von IL-6 als positiv gilt nicht (siehe Abbildung 91). Nach Zugabe von Amantadin überschritten die PBMC aller Probanden den Grenzwert. Die PBMC von vier der „Non-Responder“ bei alleiniger Stimulierung mit Tetanol (siehe Abbildung 93) und von zwei der „Non-Responder“ bei alleiniger Stimulierung mit PPD (siehe Abbildung 94) exprimierten nach Zugabe von Amantadin IL-6. Dabei waren die Mediane bei der Messung mit BCG die höchsten (siehe Abbildung 92). Nach Kostimulation der Zellen mit Amantadin und Tetanol kam es im mittleren Konzentrationsbereich (0,005 bis 5 µg/ml) (siehe Abbildung 93) wie bei Kostimulation durch PPD im oberen Verdünnungsbereich (5 µg/ml) (siehe Abbildung 93) zu einer signifikanten Inhibierung der IL-6-Bildung.

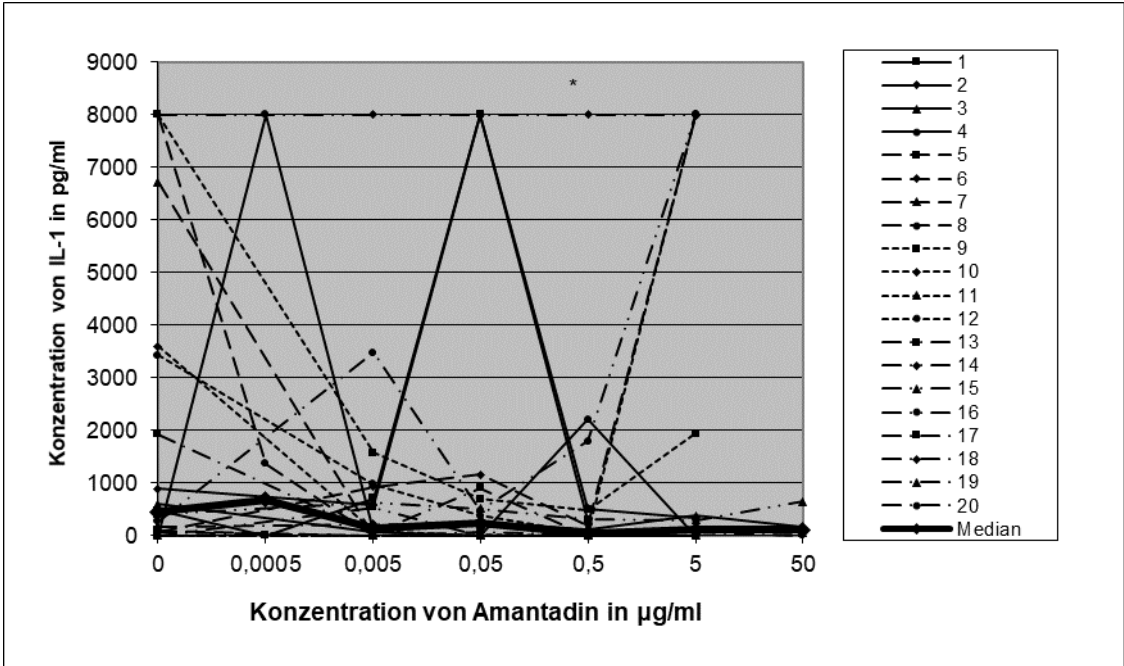
Die meisten „Responder“ ohne Amantadinzusatz bei TNF-alpha gab es bei der Kostimulation mit BCG (zwölf Probanden) (siehe Abbildung 96). Die PBMC weiterer vier Probanden reagierten nach Amantadinzugabe positiv. Nach Kostimulation mit Tetanol waren es die PBMC von zwei (Abbildung 97) und mit PPD (Abbildung 98) von drei Probanden. Mit Amantadin reagierten die Lymphozytenüberstände von zwei bzw. drei der „Non-Responder“ von Tetanol bzw. PPD positiv. Ohne Amantadin und Antigen überschritten die PBMC keines Probanden den Grenzwert, ab dem der Nachweis von TNF-alpha als positiv gilt (TNF-alpha: 312 pg/ml), was sich bei Zugabe von Amantadin bei den PBMC von vier Probanden änderte (siehe Abbildung 95). Alle Mediankurven verliefen relativ flach, wobei die des Antigens BCG die höchsten Werte aufwies. Es kam zu keinen signifikanten Inhibierungen oder Aktivierungen der TNF-alpha-Produktion durch Amantadin. Auffallend war Proband 12, dessen PBMC überall überdurchschnittlich hohe Werte zeigte.



**Abbildung 87: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

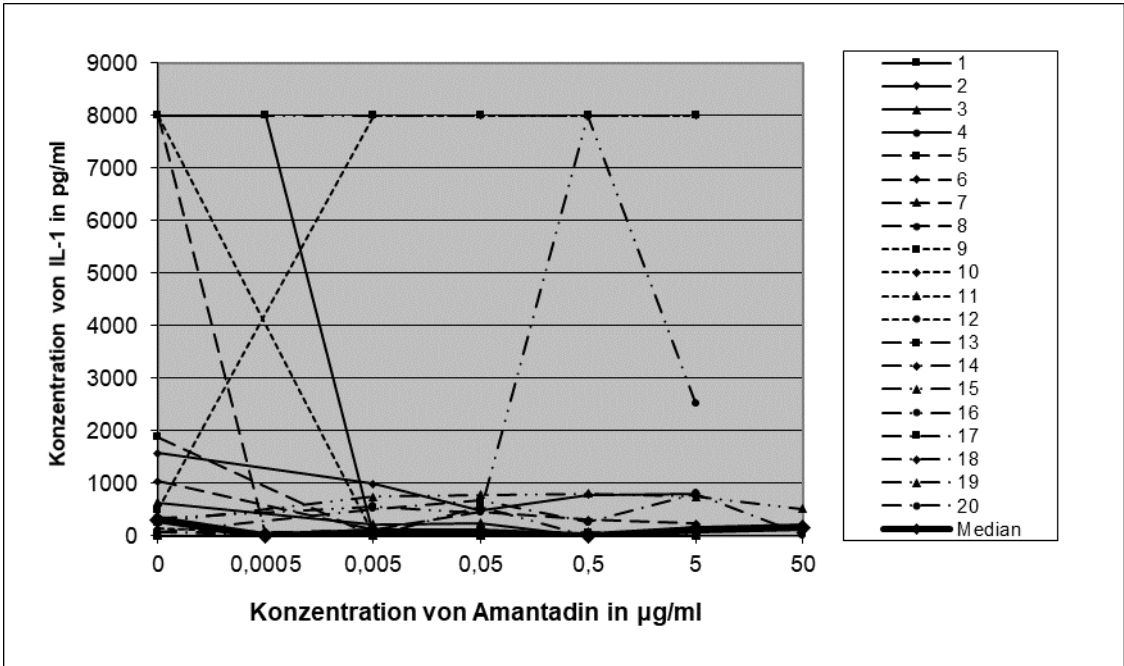


**Abbildung 88: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



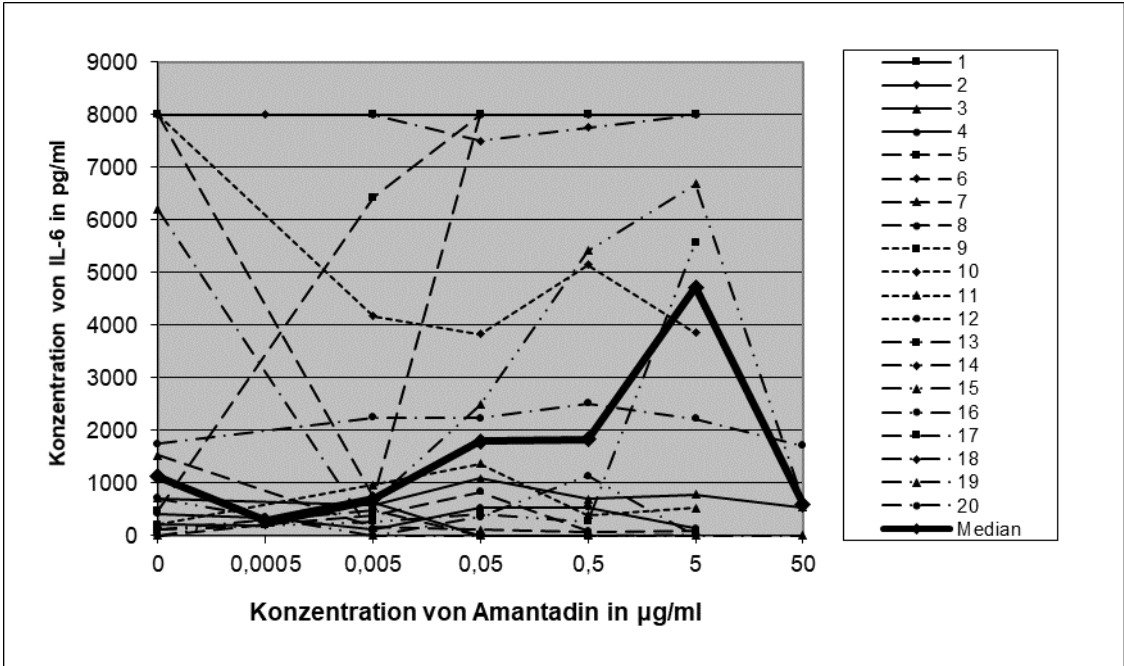
**Abbildung 89: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.

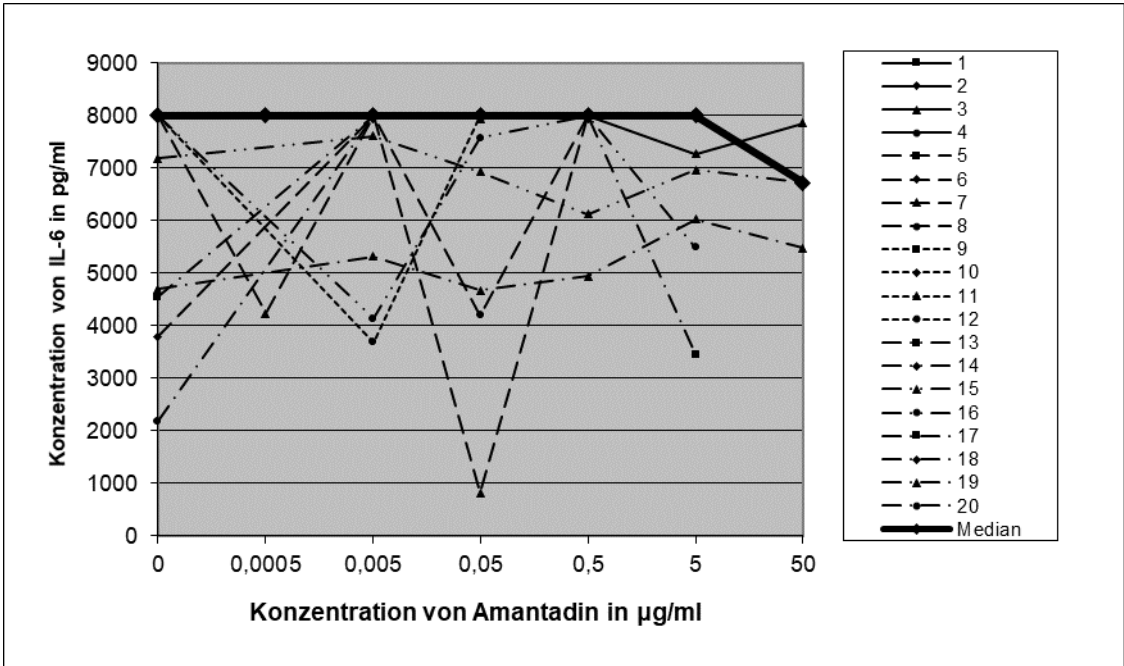


**Abbildung 90: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**

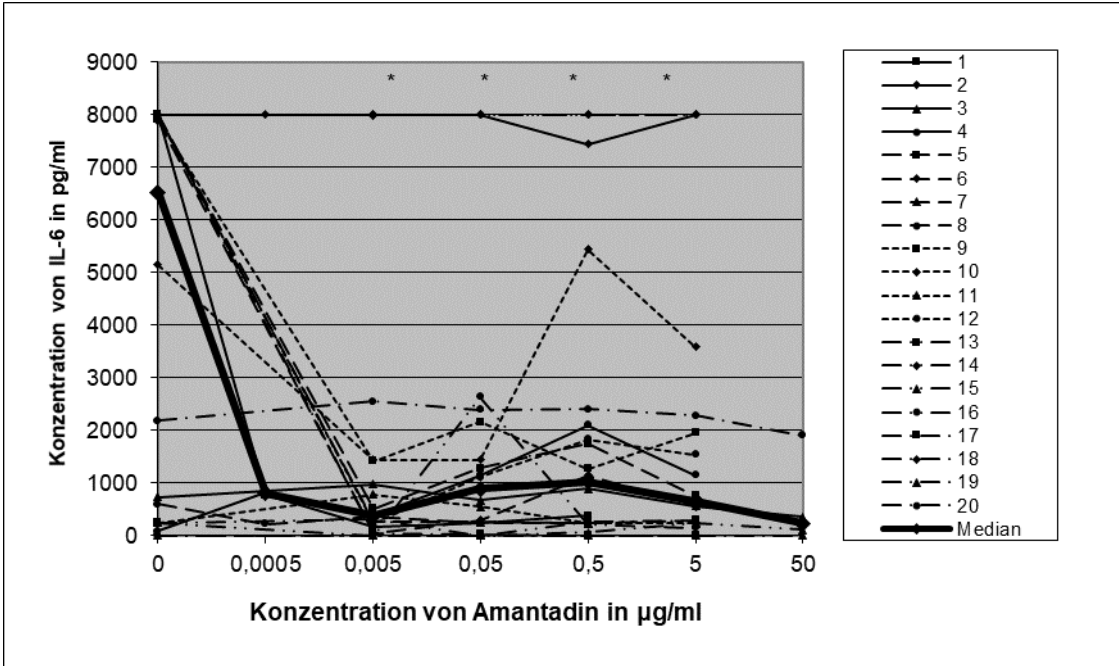
Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-1 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



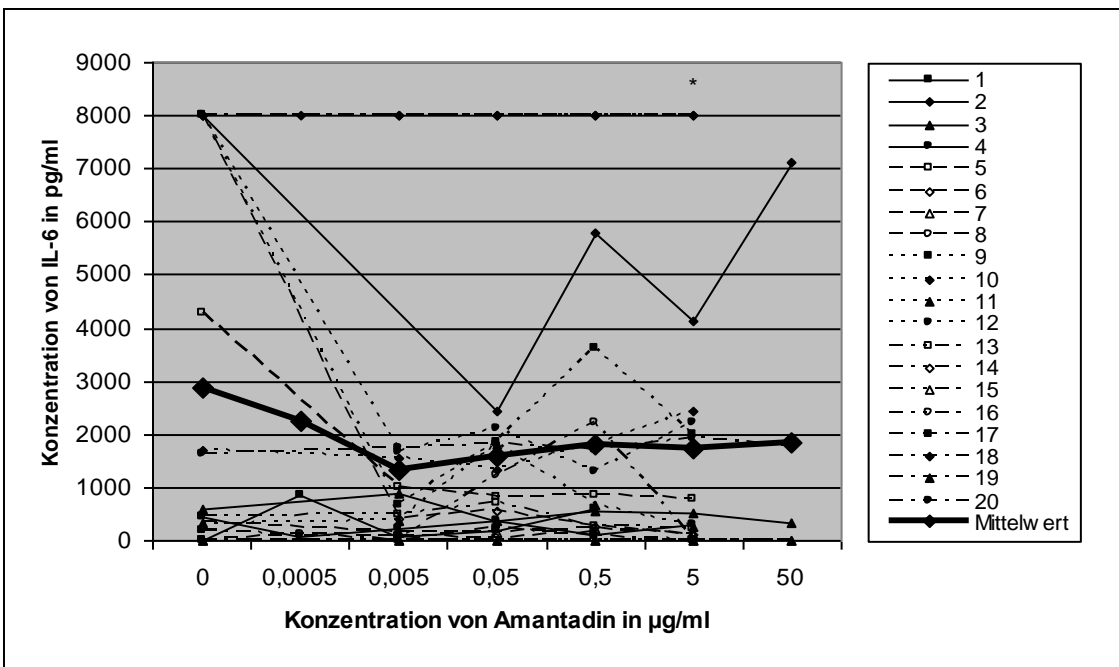
**Abbildung 91: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 92: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

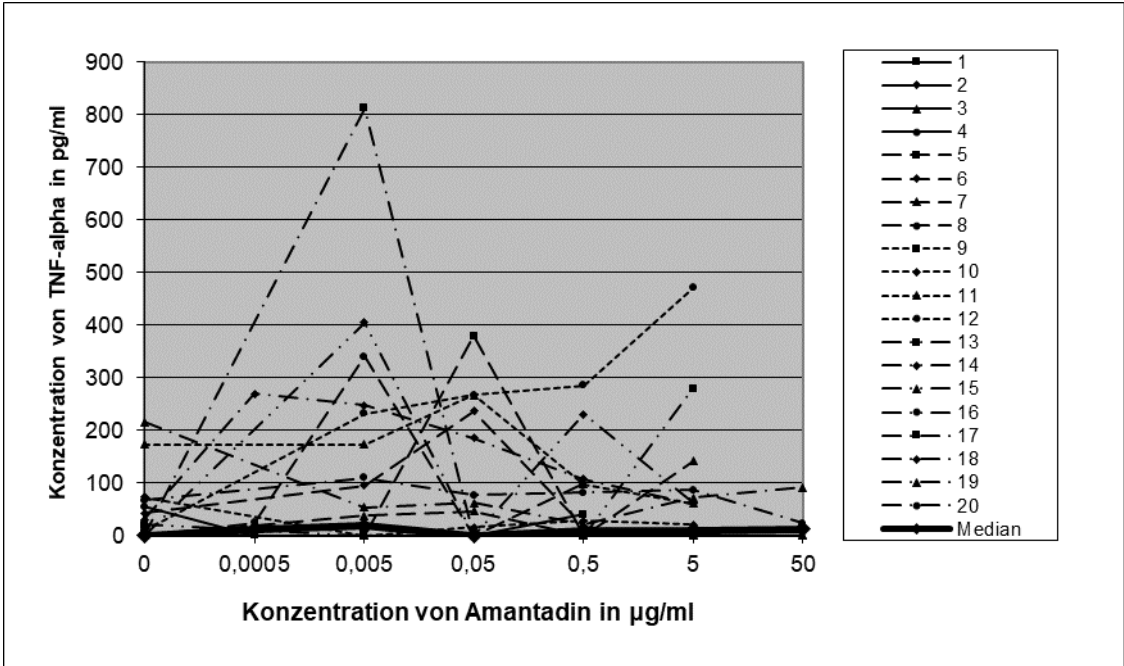


**Abbildung 93: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

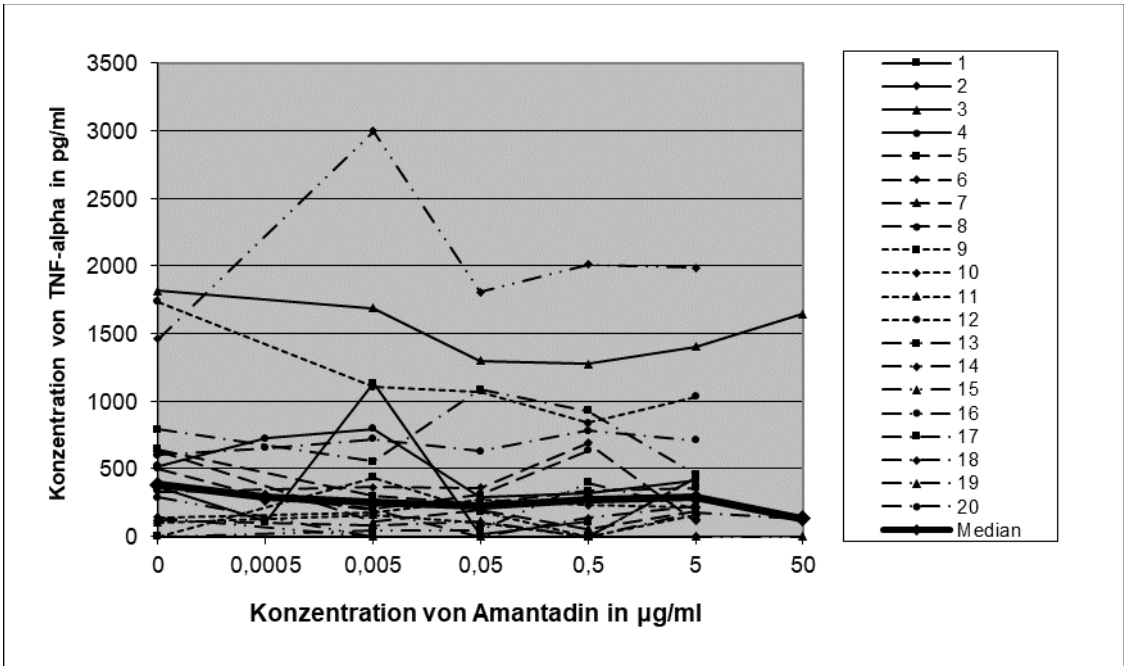


**Abbildung 94: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-6 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

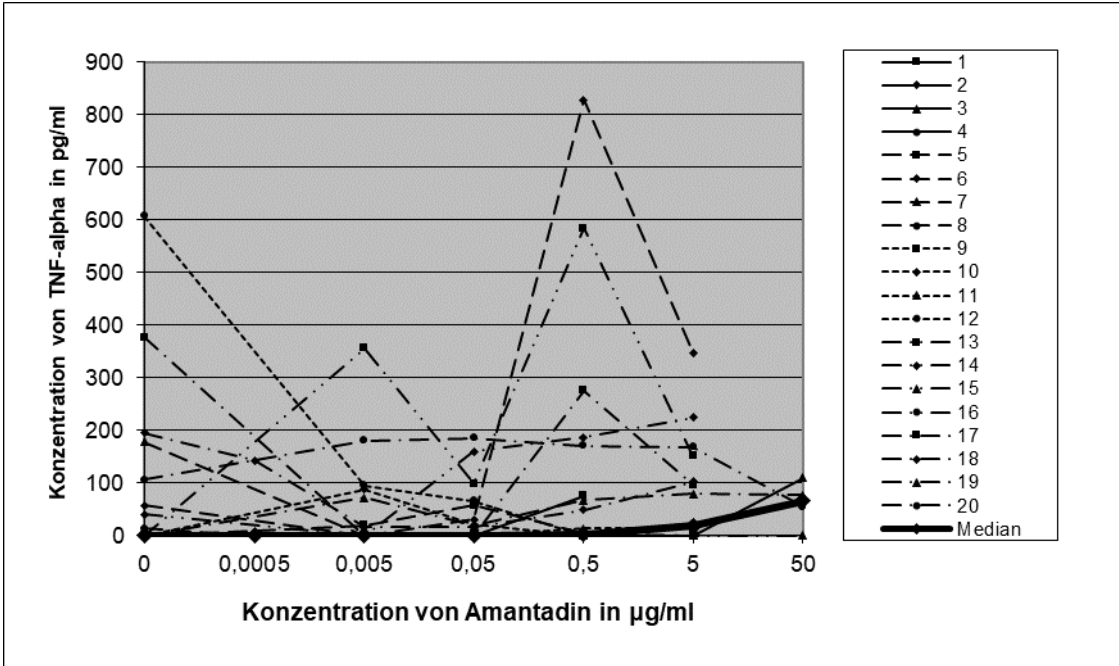




**Abbildung 95: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

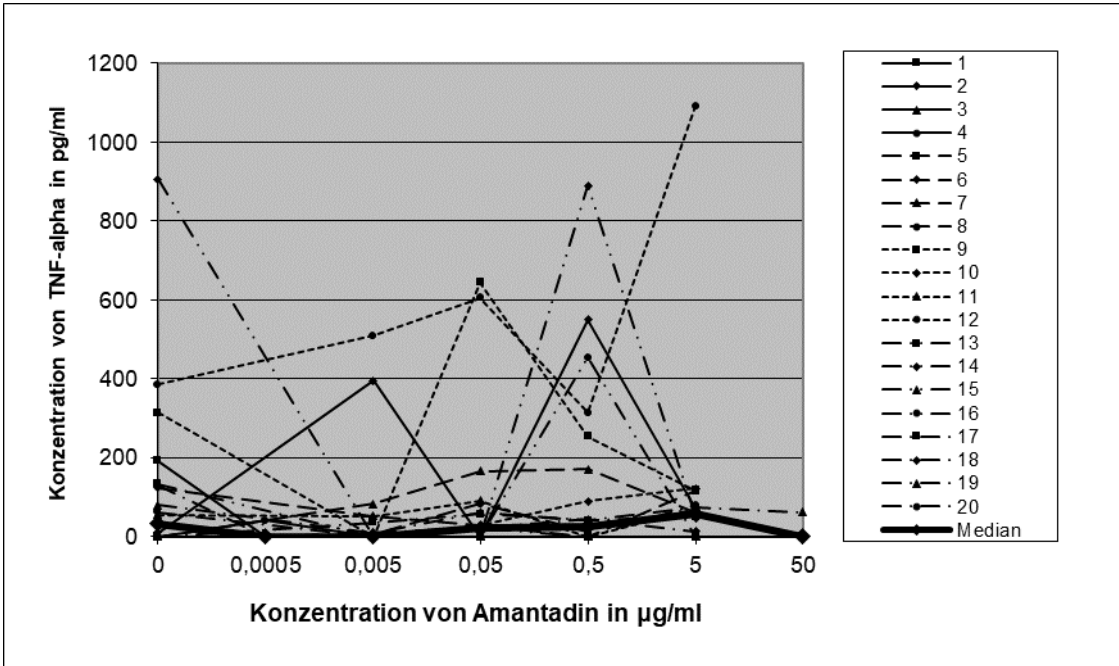


**Abbildung 96: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 97: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

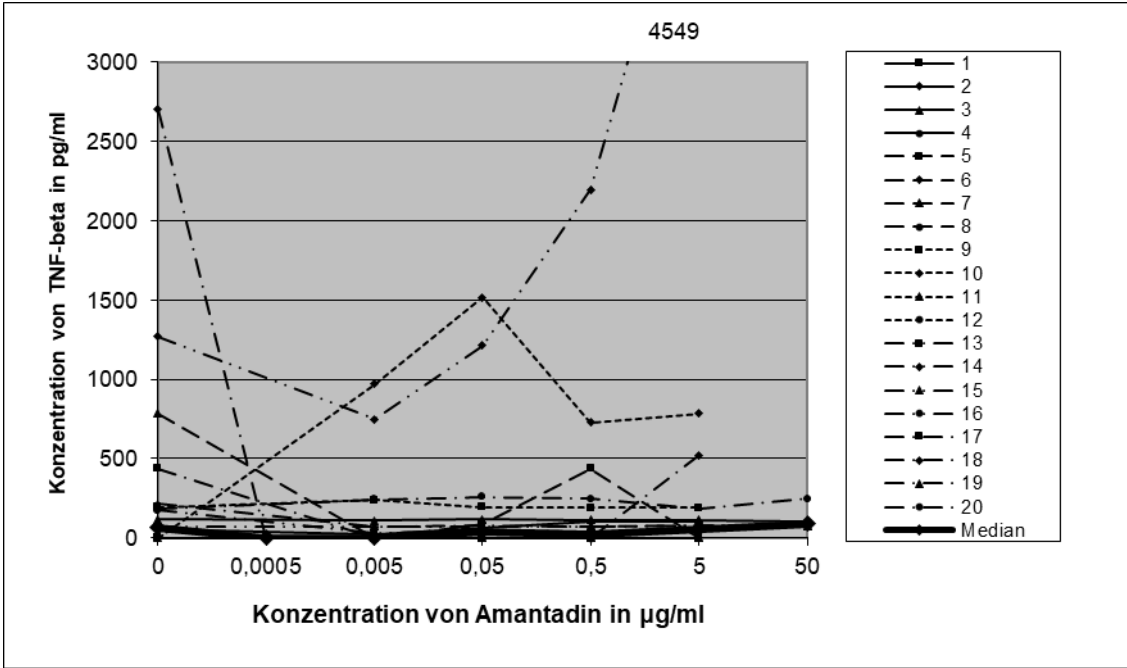
Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



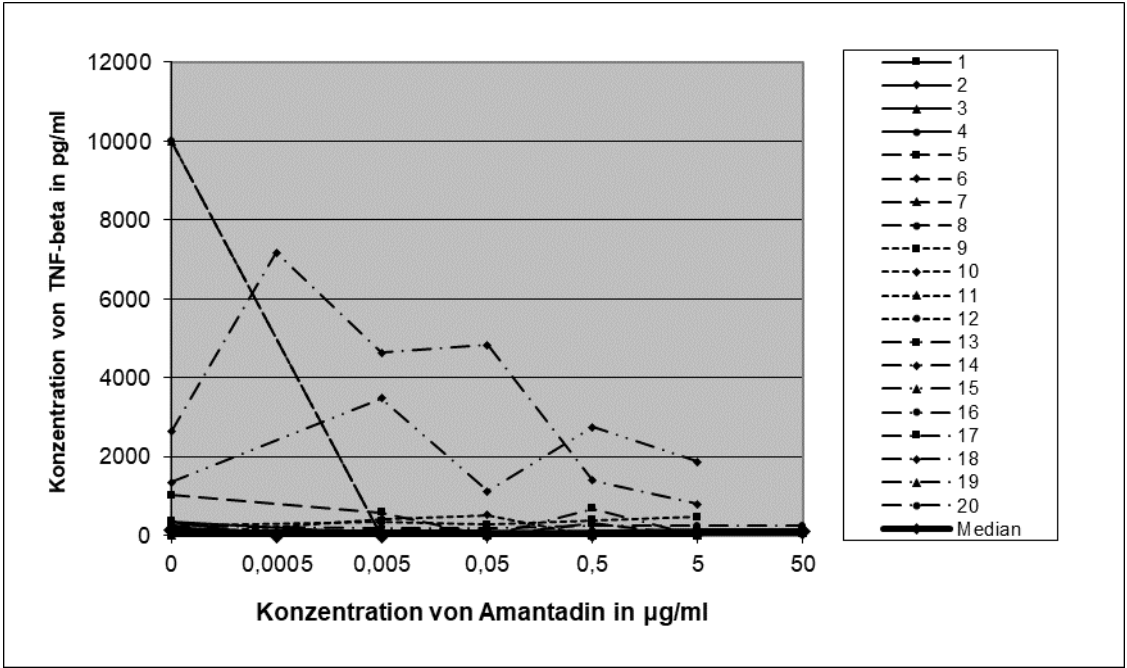
**Abbildung 98: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-alpha durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### **3.3.7 Einfluss von Amantadin auf die Produktion TH<sub>1</sub>-typischer Zytokine (TNF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ) durch PBMC**

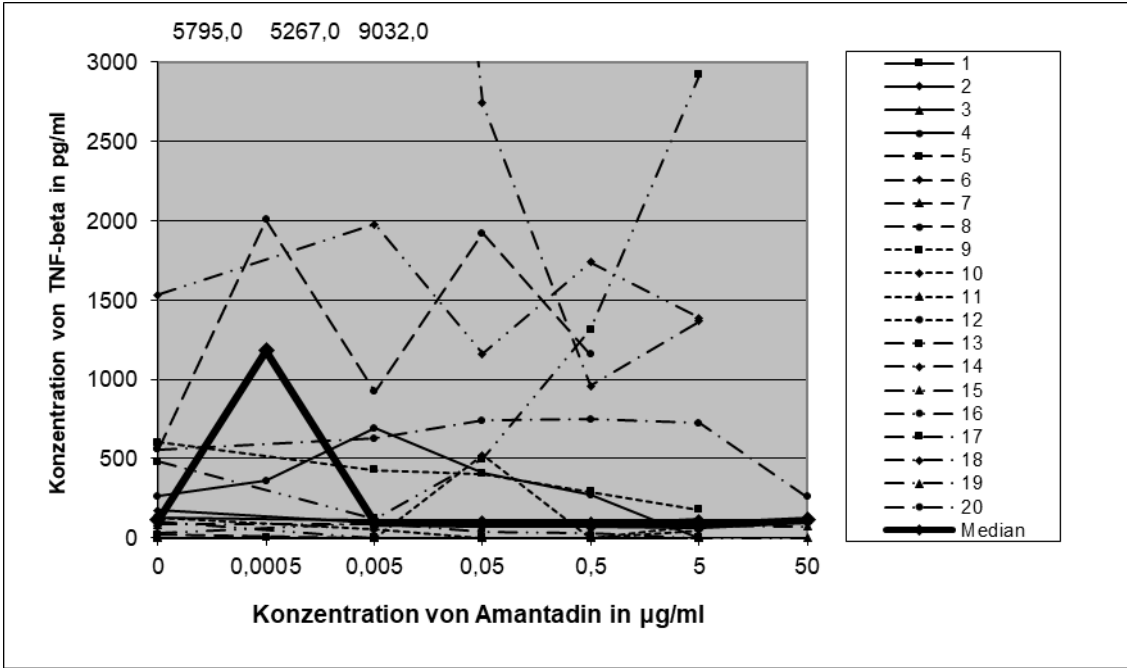
In Abwesenheit von Amantadin und den Antigenen erreichten die PBMC von vier der 20 Probanden den Grenzwert von TNF-beta, ab dem ein Nachweis als positiv gilt (TNF-beta: 312 pg/ml) (siehe Abbildung 99). Nach Zugabe von Amantadin exprimierten die PBMC von zwei weiteren Probanden TNF-beta. Von den „Non-Respondern“ überschritten nach Zugabe von Amantadin immerhin die PBMC bei zwei Probanden nach Kostimulation mit Tetanol (siehe Abbildung 101) und jeweils bei drei der Probanden nach Kostimulation mit BCG (siehe Abbildung 100) und PPD (siehe Abbildung 102) den Grenzwert. Im Median wurden nach Hinzugabe von Tetanol die höchsten Werte erreicht in der geringsten Konzentration von Amantadin. Allgemein war der Mediankurvenverlauf flach. Es kam bei der TNF-beta-Produktion zu keiner signifikanten Inhibierung oder Stimulierung. Den Grenzwert von 1250 pg/ml, ab dem der Nachweis von IFN-gamma als positiv gilt, wurde in den Lymphozytenüberständen von sechs Probanden bei Testung ohne Amantadin und Kostimulans überschritten, mit Amantadin reagierten die PBMC von zehn Probanden positiv (siehe Abbildung 103). Bei den Kostimulanzien waren die Messwerte nach Zugabe von Amantadin jeweils bei einem Probanden bei BCG (siehe Abbildung 104) und PPD (siehe Abbildung 106) und zwei Probanden bei Tetanol (siehe Abbildung 105) oberhalb des Grenzwertes. Im Median reagierten die PBMC am stärksten nach Kostimulation mit Amantadin und BCG. Die PBMC der Probanden 6, 9 und 12 lieferten überdurchschnittlich hohe Messwerte. Die INF-gamma-Produktion wurde bei Verwendung von Amantadin ohne Kostimulation bei der Konzentration 0,05  $\mu$ g/ml (siehe Abbildung 102), bei der Kostimulation mit Amantadin und BCG (siehe Abbildung 104) bei der Konzentration 0,005 und 0,5  $\mu$ g/ml, bei Kostimulation mit Tetanol (siehe Abbildung 105) bei den Konzentrationen 0,005 bis 5  $\mu$ g/ml und bei Kostimulation mit PPD (siehe Abbildung 106) bei der Konzentration 0,5  $\mu$ g/ml inhibiert.



**Abbildung 99: Wirkung von Amantadin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF- beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

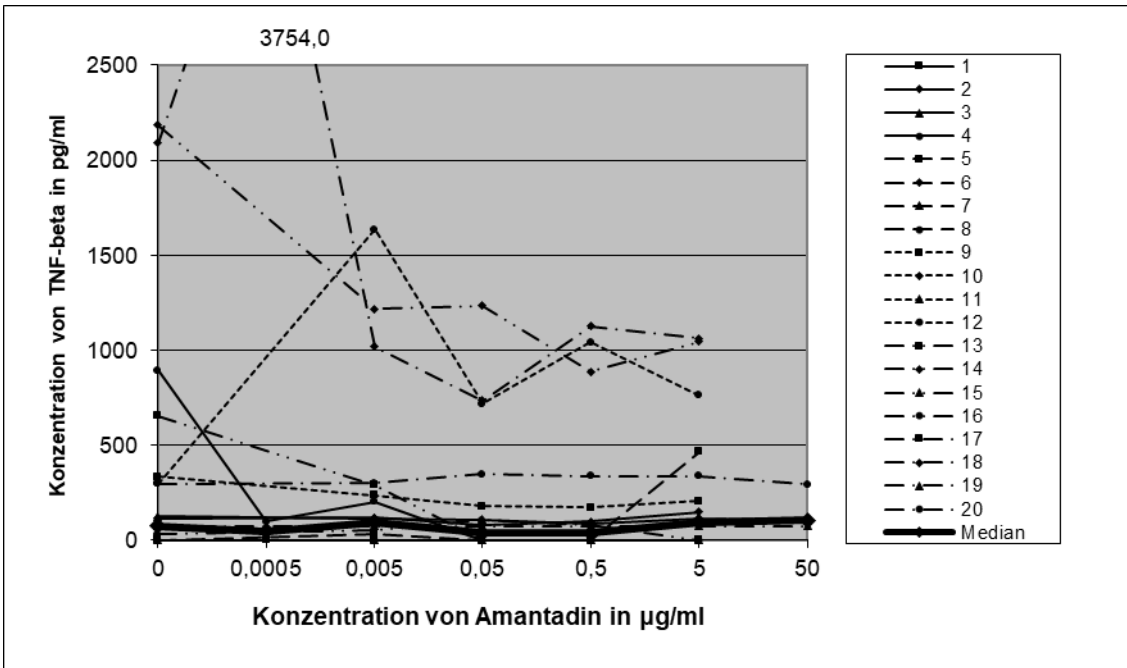


**Abbildung 100: Wirkung von Amantadin auf die TNF- beta -Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF- beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



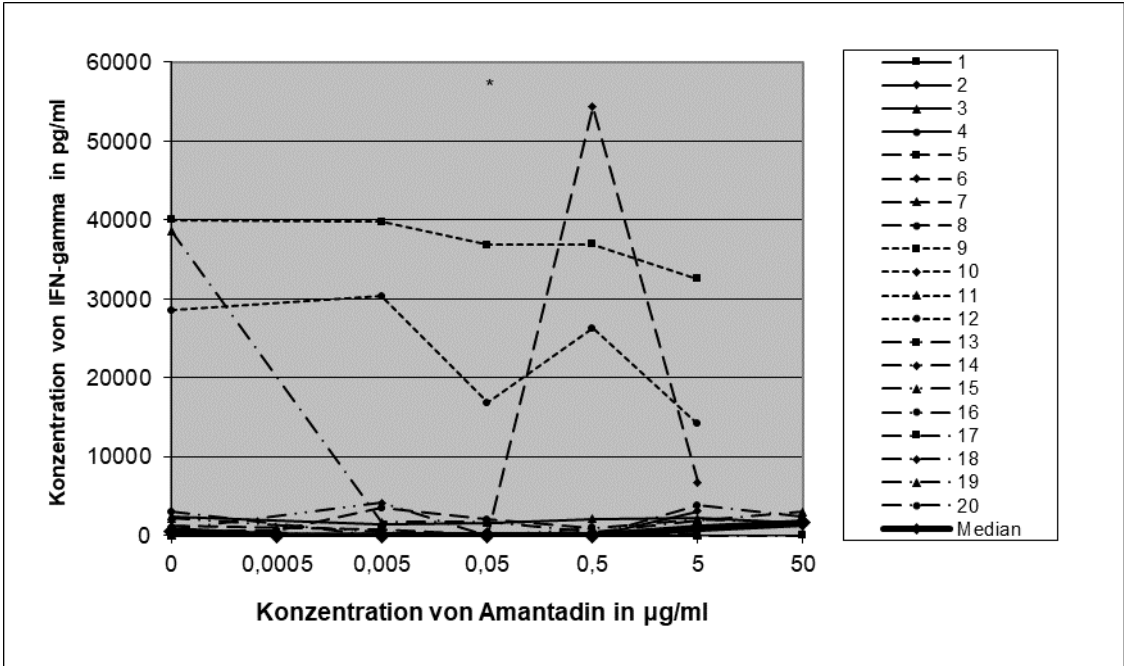
**Abbildung 101: Wirkung von Amantadin auf die TNF-beta -Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



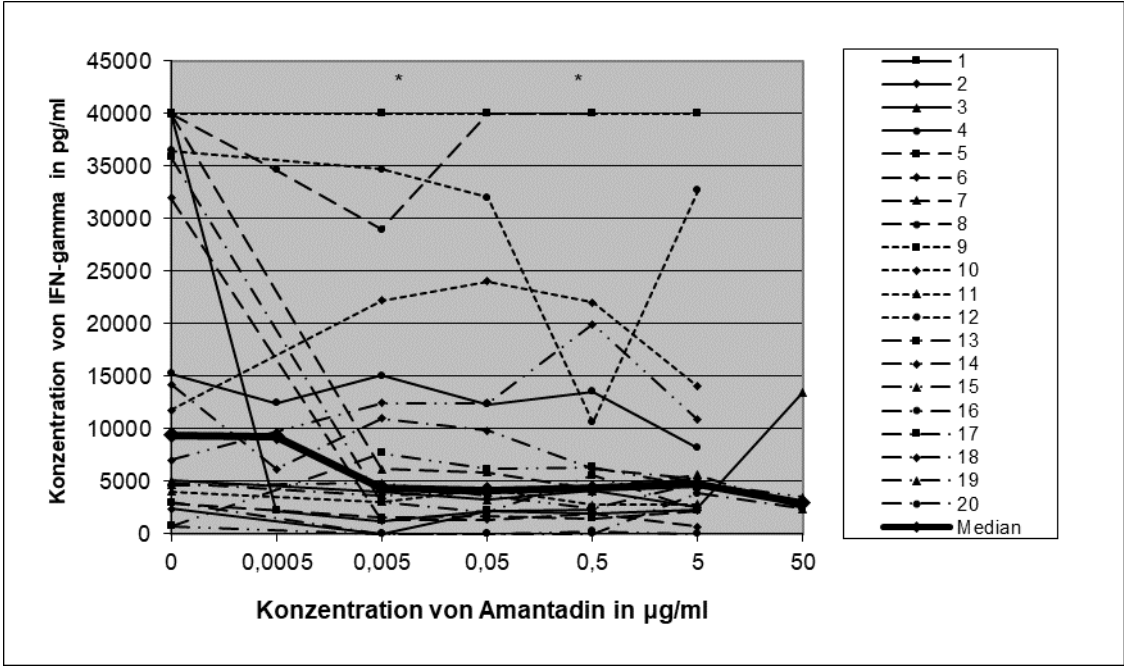
**Abbildung 102: Wirkung von Amantadin auf die TNF- beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von TNF-beta durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



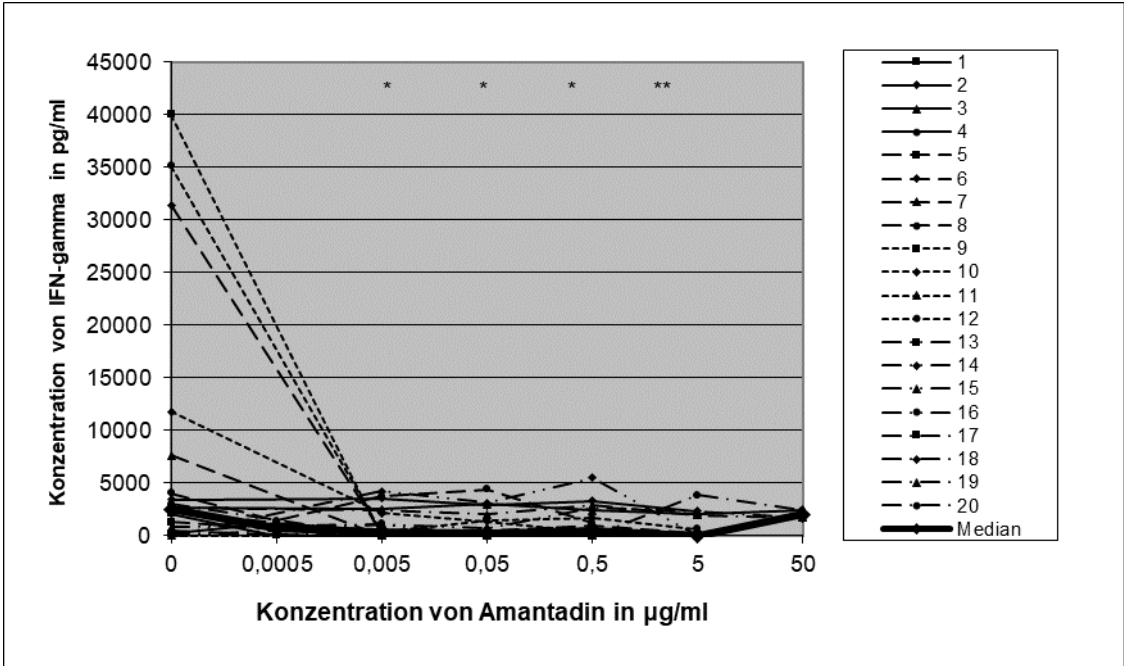
**Abbildung 103: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



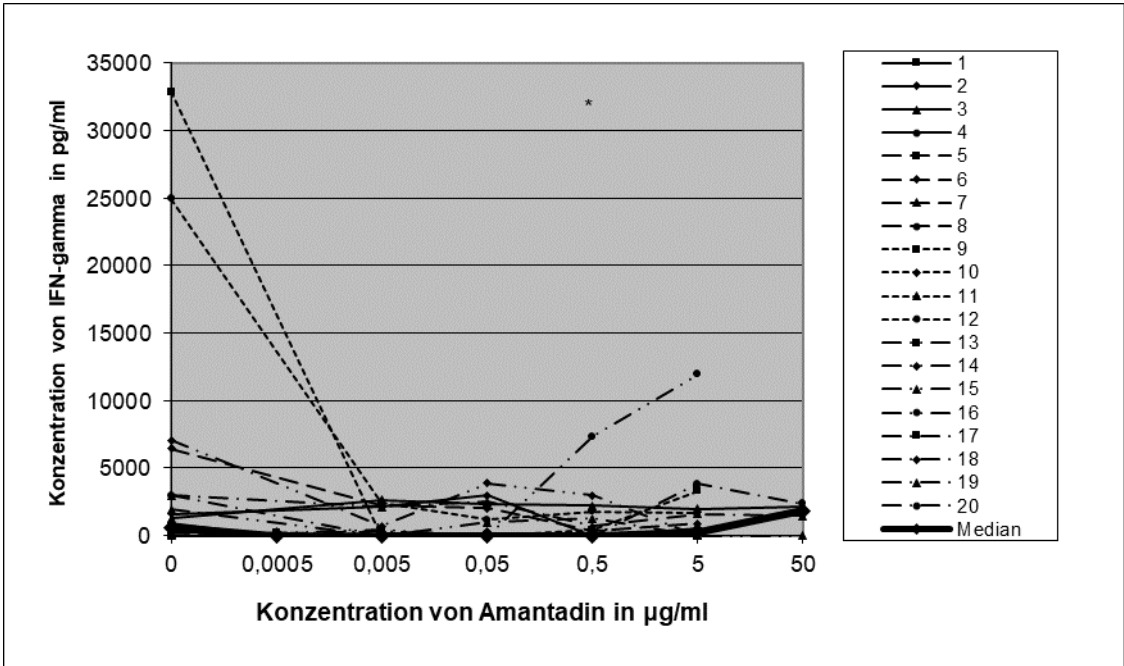
**Abbildung 104: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



**Abbildung 105: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 106: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IFN-gamma durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.

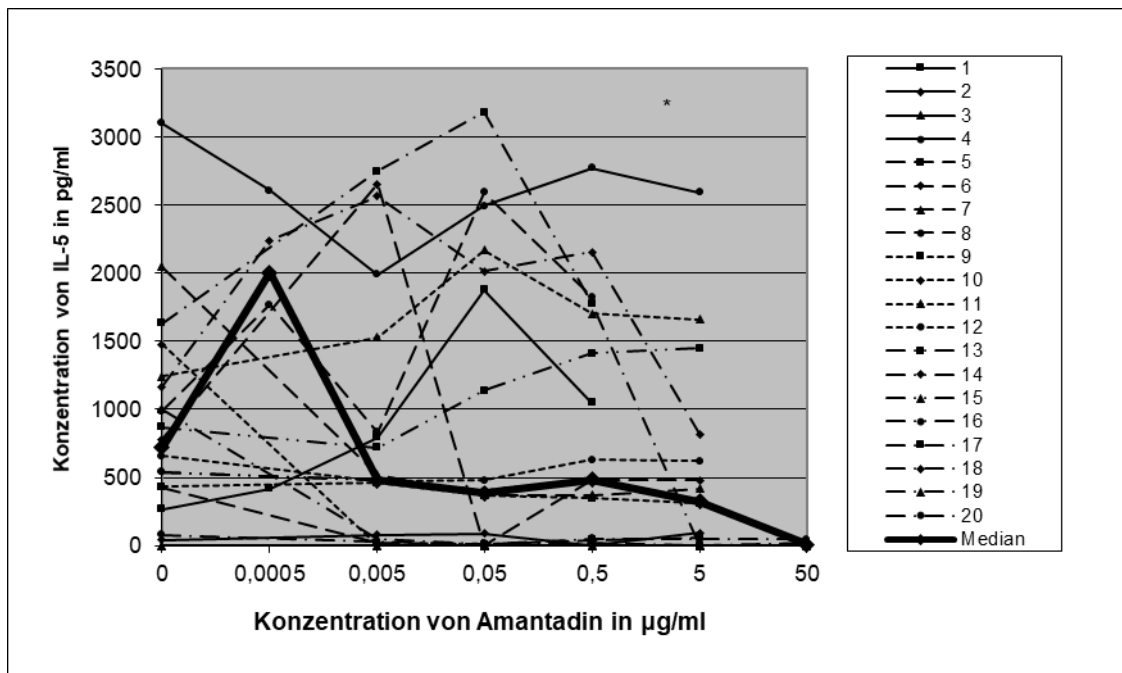
### **3.3.8 Einfluss von Amantadin auf die Produktion TH<sub>2</sub>-typischer Zytokine (IL-5, IL-13) durch PBMC**

Der Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-5 als positiv gilt, liegt bei 470 pg/ml und wurde ohne Stimulierung durch ein Antigen und ohne Zugabe von Amantadin bei den PBMC von 13 Probanden überschritten, nach Zugabe von Amantadin bei den PBMC von 14 Probanden (siehe Abbildung 107). In den Lymphozytenüberständen reagierten die PBMC von sechs Probanden nach Zugabe der Antigene BCG (siehe Abbildung 108) und PPD (siehe Abbildung 110) ohne Amantadin nicht, was sich nach Zugabe von Amantadin nur bei einem Probanden unter Kostimulation mit PPD änderte. Die alleinige Stimulierung mit Tetanol führte bei den PBMC von vier Probanden zu positiven Testwerten und nach Zugabe von Amantadin bei weiteren sechs Probanden (siehe Abbildung 109). Die Verläufe der Medianwerte waren ähnlich mit einem Maximum bei der niedrigsten Konzentration von Amantadin und einem zunächst starken und später schwachen Abfall der Kurve. Die Kurve von Tetanol erzielte dabei die höchsten Medianwerte. In den Zellüberständen des Probanden vier wurden überdurchschnittlich hohe Messwerte festgestellt. Bei Amantadin ohne Kostimulation kam es zu einer signifikanten Inhibierung der IL-5-Produktion bei der 5 µg/ml Konzentration von Amantadin (siehe Abbildung 107).

Beim Zytokin IL-13 erreichten die PBMC der meisten Probanden (17) ohne Amantadin und ohne Antigen den Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-13 als positiv gilt, was sich auch nach Zugabe von Amantadin nicht änderte (siehe Abbildung 111). Nach Zugabe von Amantadin überschritten beim Antigen BCG (siehe Abbildung 112) die PBMC eines „Non-Responders“, bei den Antigenen Tetanol (siehe Abbildung 113) und PPD (Abbildung 114) die PBMC von drei Probanden den Grenzwert. Der Verlauf der Mediankurven von Amantadin ohne Kostimulation und mit Kostimulation durch BCG war sehr ähnlich. Es kam zunächst zu einem Abfall der Messwerte bis zur zweiten Verdünnungsstufe, dann verlief die Kurve waagrecht, um bis zu höchsten Konzentration wieder abzufallen. Die Mediankurven der Antigene Tetanol und PPD ähnelten sich

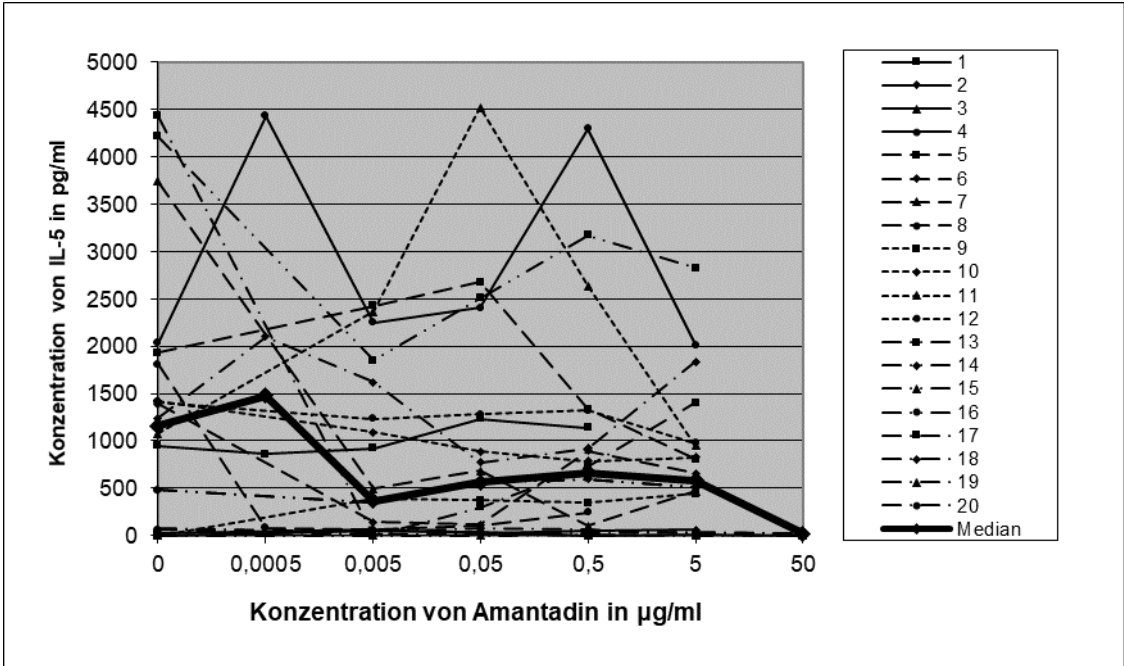


auch sehr. Sie stiegen zunächst an, um nach der niedrigsten Verdünnungsstufe zunächst stark und später schwach abzufallen. Die Probanden 5, 12, 18 und 20 fielen mit überdurchschnittlich hohen Messwerten auf. Die IL-13-Produktion wurde bei Kostimulation mit Amantadin und BCG bei den Konzentrationen 0,005 bis 0,5 µg/ml (siehe Abbildung 112) und nach Kostimulation mit Tetanol bei den Konzentrationen 0,005-, 0,05- und 5 µg/ml (siehe Abbildung 113) signifikant inhibiert.



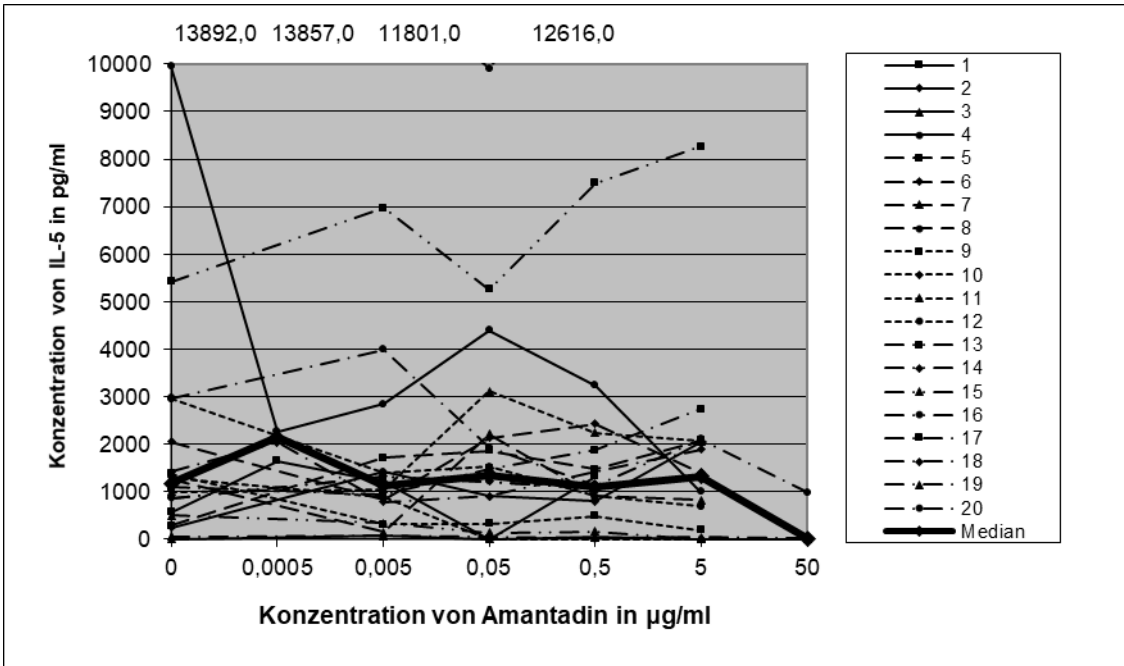
**Abbildung 107: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0,05 mit \*, p < 0,01 mit \*\* und p < 0,001 mit \*\*\*.



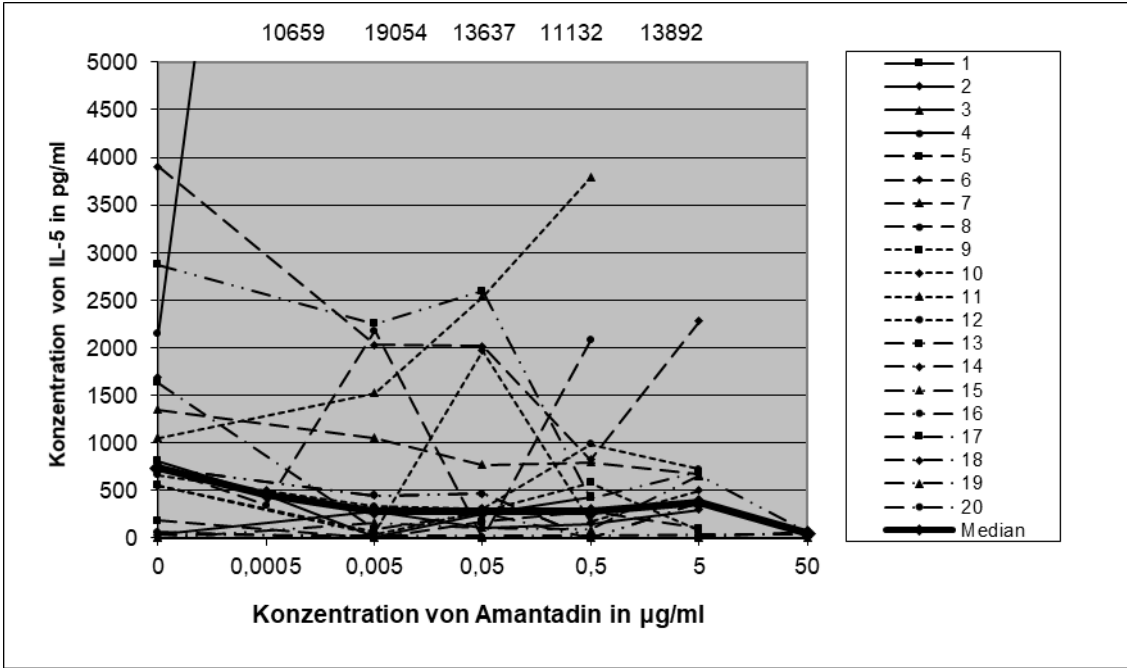
**Abbildung 108: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**

Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

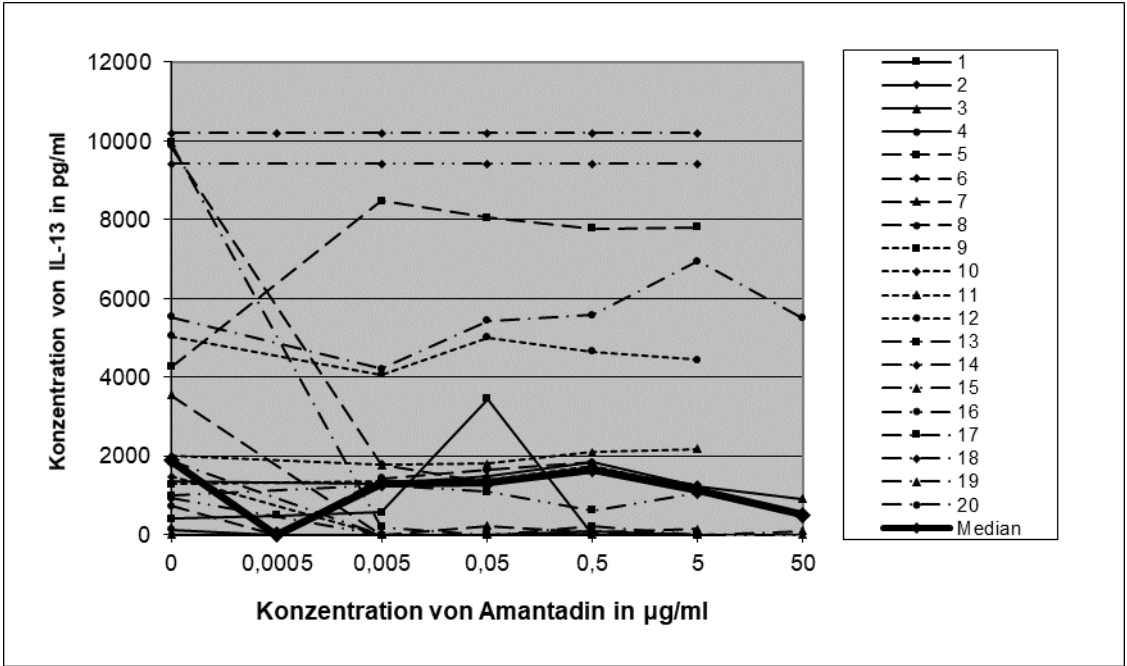


**Abbildung 109: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**

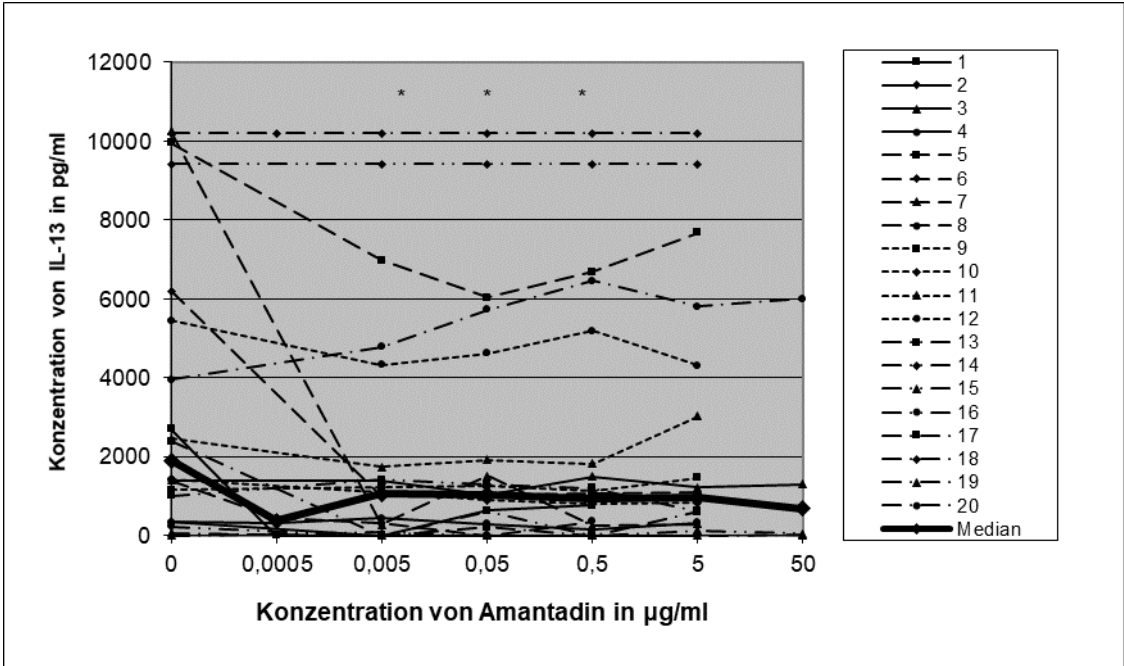
Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



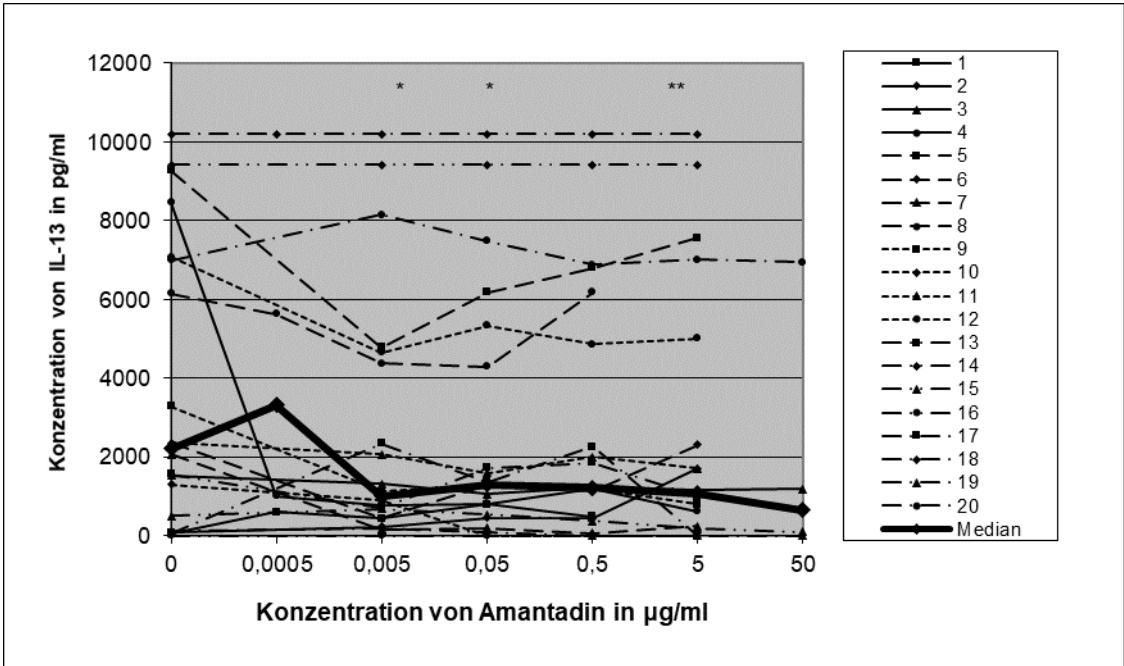
**Abbildung 110: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-5 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



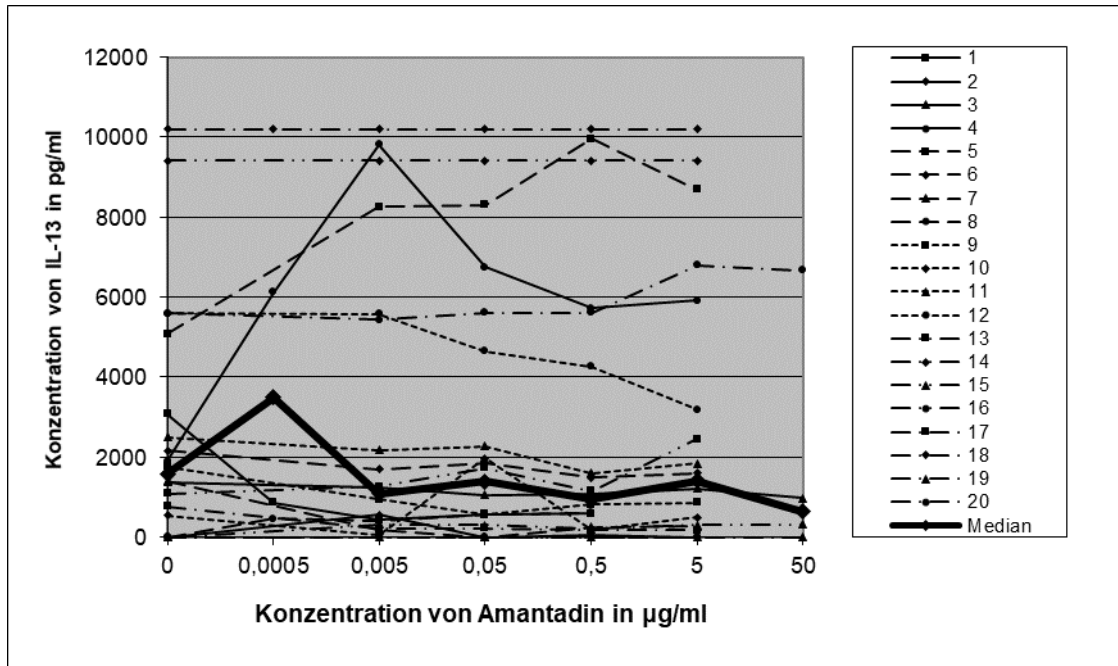
**Abbildung 111: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 112: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



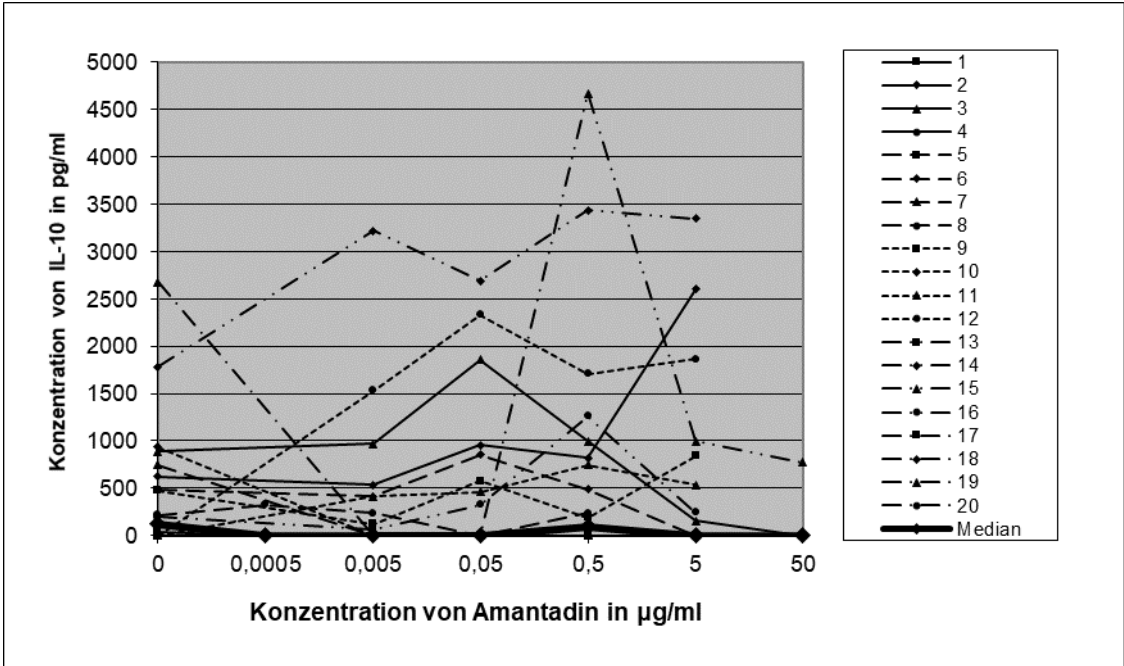
**Abbildung 113: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.



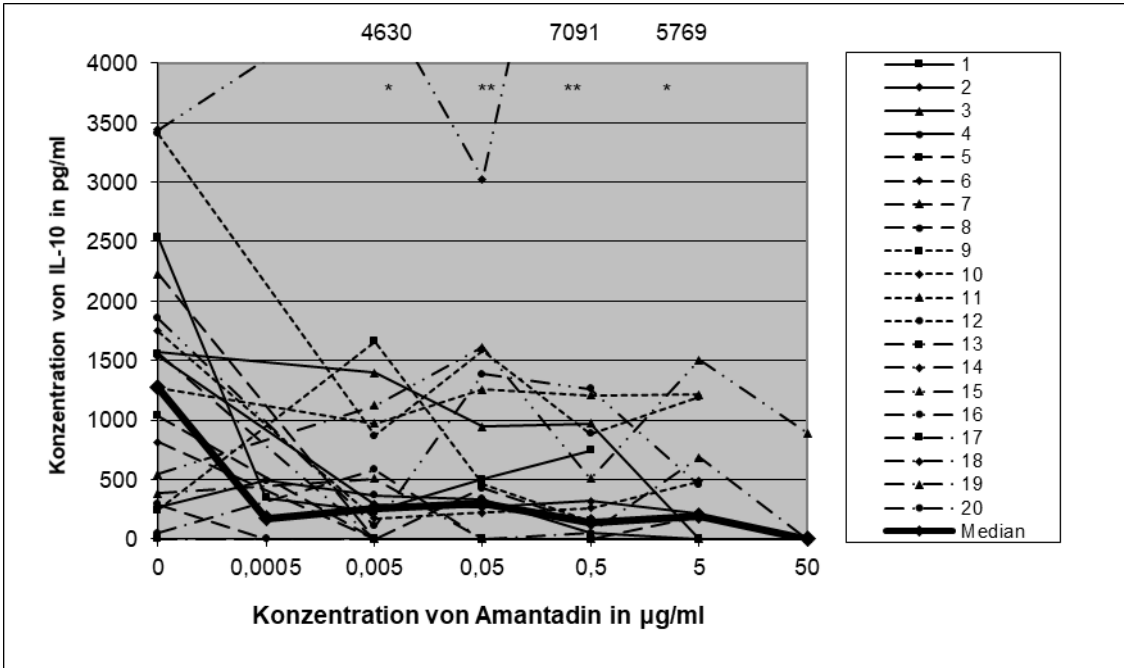
**Abbildung 114: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-13 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.3.9 Einfluss von Amantadin auf die Produktion regulatorischer T-Zellen-typischer Zytokine (IL-10) durch PBMC

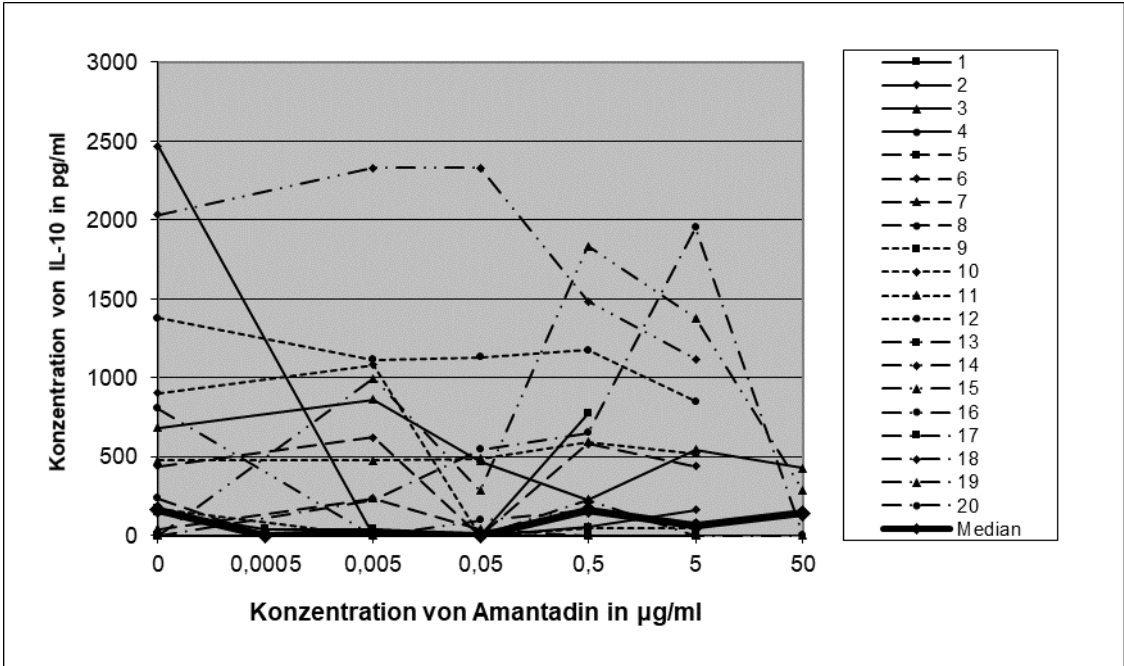
Die PBMC der Hälfte der Probanden überschritt ohne Antigen und Amantadin den Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-10 als positiv gilt, nicht (IL-10: 156 pg/ml), wovon drei mit Amantadin den Grenzwert überschritten (siehe Abbildung 115). Bei den Antigenen BCG (siehe Abbildung 116) bzw. Tetanol (siehe Abbildung 117) bzw. PPD (siehe Abbildung 118) überschritten nach Zugabe von Amantadin die PBMC von einem bzw. drei bzw. vier Probanden den Grenzwert. Die Mediankurven fielen anfangs ab, stiegen nach der ersten Verdünnungsstufe wieder an und nahmen gegen Ende wieder ab. Die Probanden zwölf und 14 hatten auffallend häufig überdurchschnittlich hohe Messwerte mit und ohne Kostimulans. Es kam bei der IL-10-Produktion bei Amantadin mit Kostimulation durch BCG bei den Verdünnungen 0,005 bis 5 µg/ml zu einer signifikanten Inhibierung (siehe Abbildung 116).



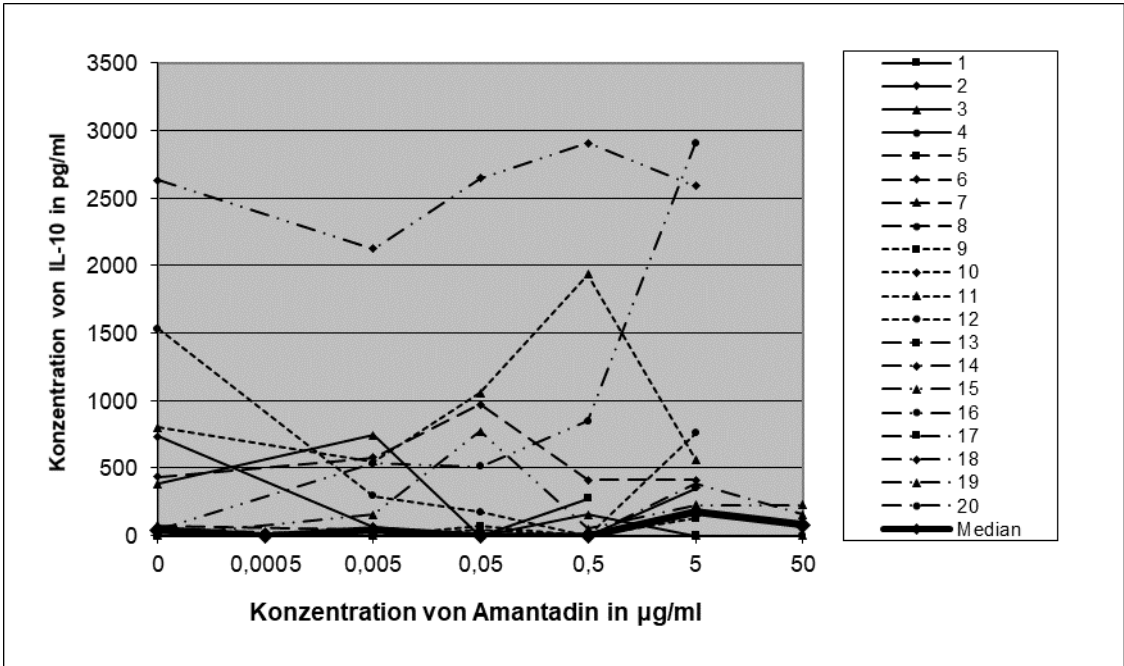
**Abbildung 115: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 116: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



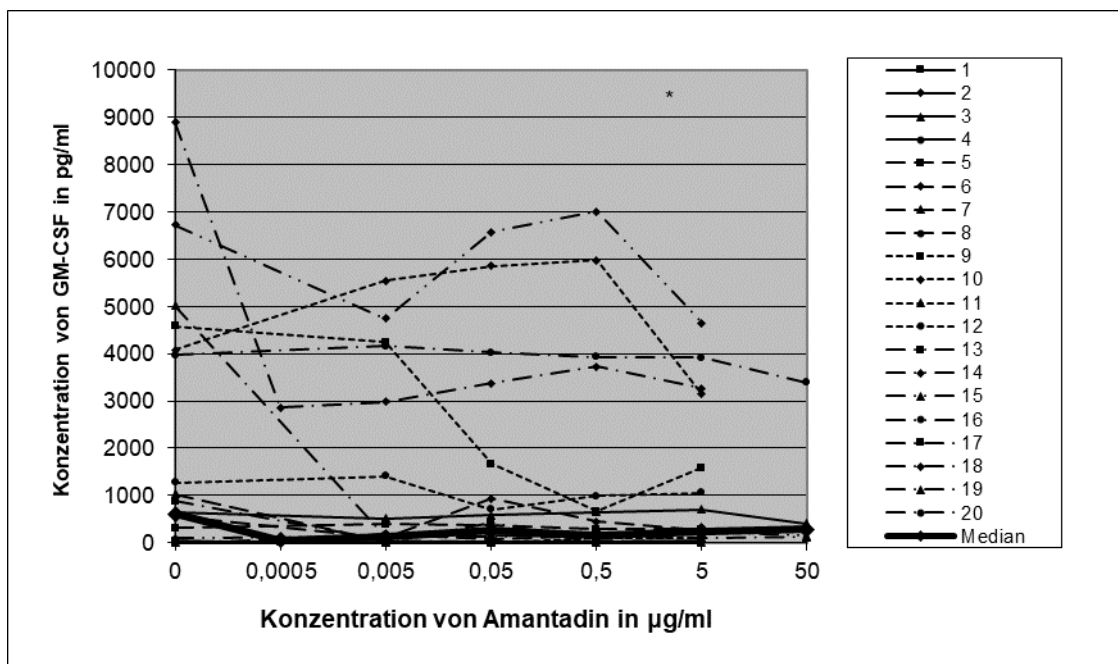
**Abbildung 117: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanol. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 118: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von IL-10 durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

### 3.3.10 Einfluss von Amantadin auf die Produktion allgemeiner T-Zellmarker (GM-CSF) durch PBMC

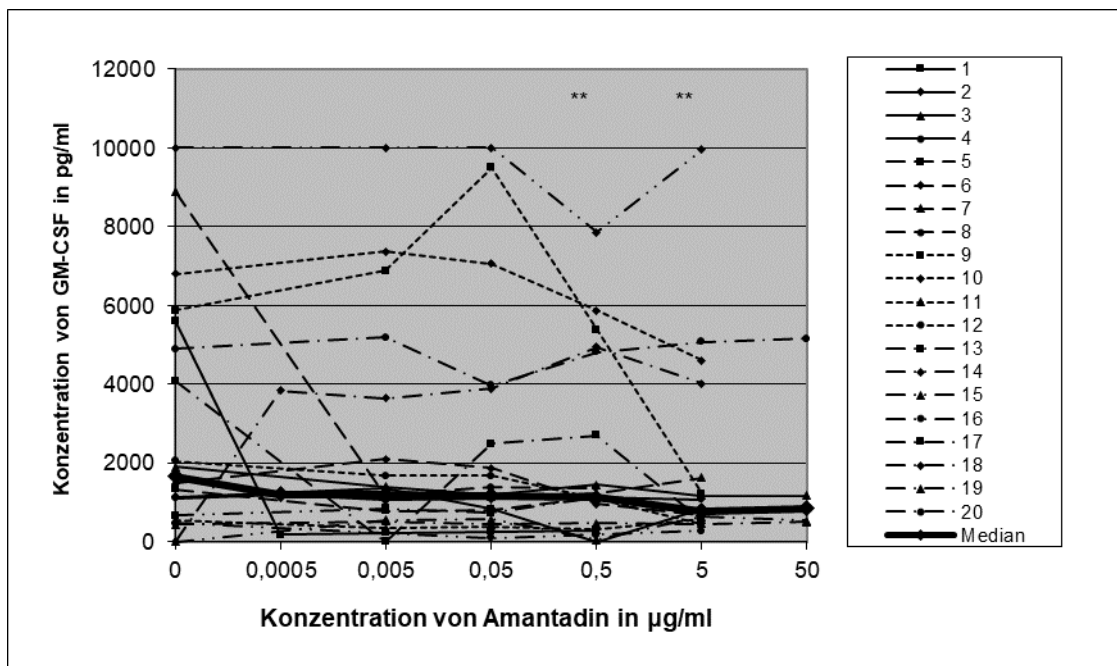
Den Grenzwert von 312 pg/ml, ab dem der Nachweis von GM-CSF als positiv gilt, wurde ohne Antigen und ohne Amantadin von den PBMC von 13 Probanden überschritten, nach Stimulierung mit Amantadin von den PBMC eines weiteren Probanden (siehe Abbildung 119). Unter den „Non-Respondern“ nach BCG- (siehe Abbildung 120) und PPD-Zugabe (Abbildung 122) exprimierten nach Kostimulation mit Amantadin die PBMC jeweils eines Probanden GM-CSF, bei Tetanol fiel der Test bei allen Probanden negativ aus (siehe Abbildung 121). Im Median wurden nach Kostimulation mit BCG die höchsten Werte erreicht. U. a. wurden in den Lymphozytenüberständen der Probanden zehn und 20 überdurchschnittlich hohe Messwerte gemessen. Die GM-CSF-Produktion wurde durch Amantadin ohne Kostimulans bei der Konzentration 5 µg/ml (siehe Abbildung 119), bei Kostimulation mit BCG bei den Konzentrationen 0,5- und 5 µg/ml (siehe Abbildung 120), bei Kostimulation mit Tetanol bei den Konzentrationen 0,005- und 0,05 µg/ml (siehe Abbildung 121) und bei Kostimulation mit PPD bei den Konzentrationen 0,05- und 5 µg/ml (siehe Abbildung 122) signifikant inhibiert.



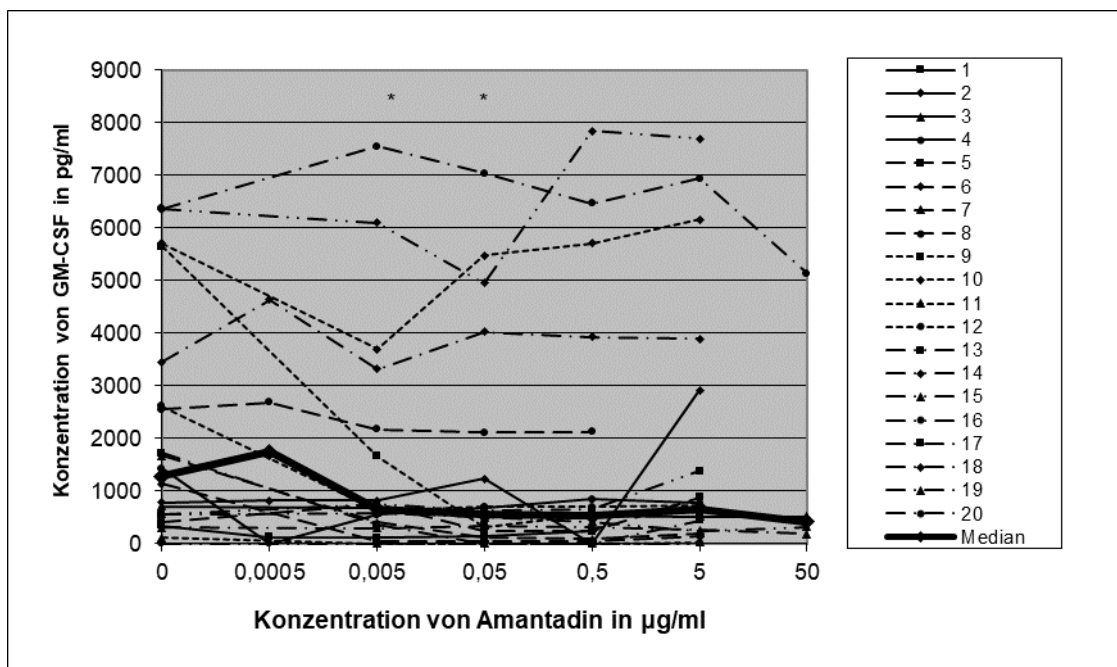
**Abbildung 119: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden in Abwesenheit anderer Antigene. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden.



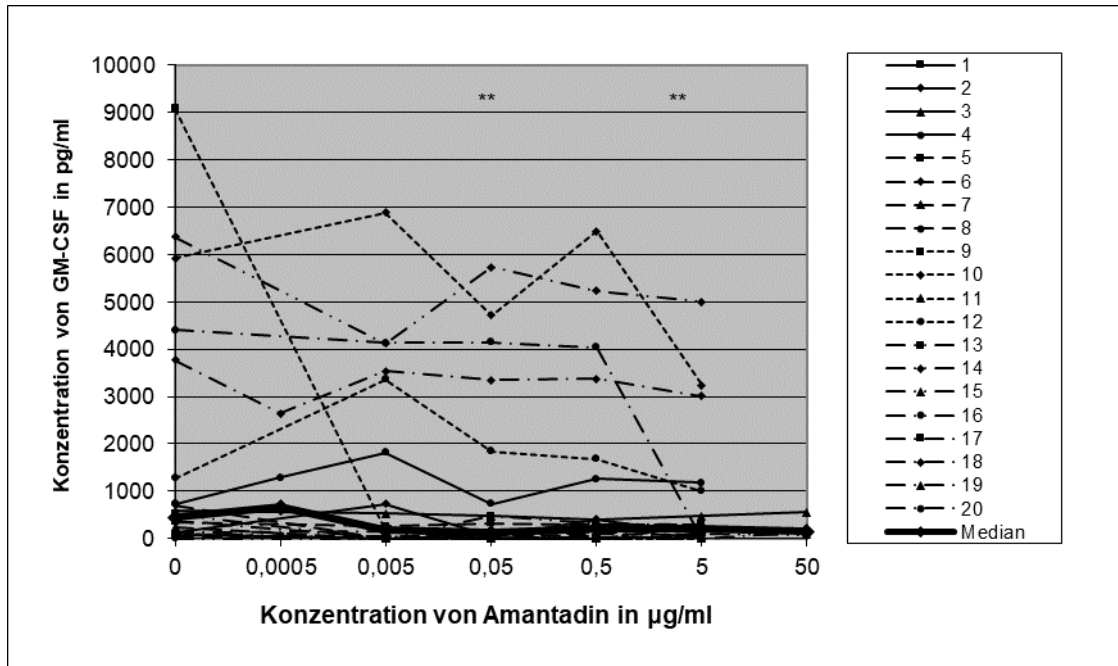
Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 120: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit BCG. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 121: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanoid**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit Tetanoid. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet:  $p < 0.05$  mit \*,  $p < 0.01$  mit \*\* und  $p < 0.001$  mit \*\*\*.



**Abbildung 122: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD**  
 Vergleich der Wirkung von Amantadin auf die Produktion von GM-CSF durch PBMC bei 20 gesunden Probanden nach Kostimulation mit PPD. Die Konzentrationen 0,0005 und 50 µg/ml beziehen sich auf jeweils vier Probanden. Statistisch signifikante p-Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0.05 mit \*, p < 0.01 mit \*\* und p < 0.001 mit \*\*\*.

### 3.3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse des Zytokin-ELISAs

Bei den Makrophagen-typischen Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF-alpha wurde von den PBMC der meisten Probanden die Zytokine IL-1 und IL-6 oberhalb der Nachweisgrenze ausgeschüttet. Beim Zytokin TNF-alpha wiederum wurde der Grenzwert bei den meisten Probanden nicht überschritten. Die Zugabe von Ribavirin zu den Zytokinen bewirkte bei den meisten Probanden keine große Veränderung der Messwerte. Nach Kostimulation mit Ribavirin und Tetanol kam es im mittleren Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Supprimierung der IL-1- und IL-6-Produktion. Im höheren Konzentrationsbereich kam es bei Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und Tetanol zu einer Stimulierung der IL-6- und TNF-alpha-Produktion.

In den wenigsten Zellüberständen der Probanden reagierten die TH<sub>1</sub>-typischen Zytokine TNF-beta und IFN-gamma positiv ohne Zugabe eines Antigens oder von Ribavirin, was sich durch die Zugabe von PPD, Tetanol und BCG in ansteigender Reihenfolge bei der IFN-gamma-Produktion, nicht aber bei der

TNF-beta-Produktion, zunehmend änderte. Bei Kostimulation mit Ribavirin und BCG, Tetanol sowie PPD kam es im mittleren und oberen Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Supprimierung der TNF-beta-Bildung. Bei den IFN-gamma-Zytokinen kam es bei Ribavirin alleine im oberen Verdünnungsbereich und nach Kostimulation mit Tetanol im unteren und oberen Verdünnungsbereich zu einer signifikanten Supprimierung.

Bei der Produktion TH<sub>2</sub>-typischer Zytokine IL-5 und IL-13 ohne Stimulierung durch Ribavirin oder ein Antigen reagierten die PBMC bei der Mehrheit der Probanden positiv. Die Zugabe von Ribavirin führte bei den PBMC einiger „Non-Responder“ zu positiven Testreaktionen. Durch die Kostimulation mit Ribavirin und BCG wurde die IL-5-Produktion im mittleren Konzentrationsbereich inhibiert, bei Kostimulation mit Tetanol im unteren Konzentrationsbereich aktiviert und im oberen inhibiert. Die IL-13-Produktion wurde bei Stimulierung der Zellen mit Ribavirin alleine in unteren und mittleren Verdünnungen supprimiert und bei Kostimulation mit Ribavirin und BCG in unteren, mittleren und hohen Konzentrationen sowie bei Kostimulation mit Tetanol im oberen Verdünnungsbereich inhibiert.

Die PBMC von ungefähr der Hälfte der Probanden erreichte ohne Stimulanzen den Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-10 als positiv gilt. Bei Stimulation mit PPD exprimierten die PBMC von sehr wenigen Probanden IL-10, was sich nach Zugabe von Ribavirin allerdings zugunsten der „Responder“ änderte. Die IL-10-Produktion wurde im unteren Verdünnungsbereich signifikant inhibiert bei Kostimulation mit Ribavirin und BCG.

In den Lymphozytenüberständen von weniger als der Hälfte der Probanden kam es zu einer positiven Testreaktion beim Nachweis des Zytokins GM-CSF, was sich nach Zugabe von Ribavirin nur gering änderte. Im oberen Konzentrationsbereich kam es sowohl bei Kostimulation mit Ribavirin und BCG als auch mit PPD zu einer signifikanten Inhibierung der GM-CSF-Produktion.

Bei den Makrophagen-typischen Zytokinen exprimierten die PBMC von knapp der Hälfte der Probanden ohne Amantadin und Kostimulans IL-1, was sich nach Zugabe von Amantadin bei den PBMC der Hälfte der „Non-Responder“ änderte. Bei den Zytokinen bewirkte die Zugabe von Amantadin bei wenigen „Non-

Respondern“ eine deutliche Zunahme der Messwerte. Wie durch Ribavirin wurde die IL-1- und IL-6-Produktion im mittleren Verdünnungsbereich nach Kostimulation der Zellen mit Amantadin und Tetanol signifikant inhibiert. Weiterhin wurde die IL-6-Produktion bei Kostimulation mit Amantadin und PPD im oberen Verdünnungsbereich signifikant supprimiert. Ohne Amantadin- und Antigenbeigabe erreichten die PBMC von gut der Hälfte der Probanden den Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-6 als positiv gilt, allerdings überschritten die PBMC aller Probanden den Grenzwert nach Zugabe von Amantadin. Die PBMC einiger „Non-Responder“ bei alleiniger Stimulierung mit den Antigenen überschritten nach Zugabe von Amantadin den Grenzwert. Der Grenzwert, ab dem der Nachweis von TNF-alpha als positiv gilt, wurde ohne Zusatz eines Antigens und von Amantadin von den PBMC keines Probanden überschritten, was sich auch nach Zugabe von Amantadin bei nur wenigen Probanden änderte. Des Weiteren bewirkte Amantadin bei den PBMC einiger „Non-Respondern“ bei alleiniger Stimulierung mit den Antigenen eine deutliche Zunahme der Messwerte. Es kam zu keinen signifikanten Inhibierungen oder Aktivierungen der TNF-alpha-Produktion durch Amantadin.

Bei der Testung der TH<sub>1</sub>-typischen Zytokine TNF-beta und IFN-gamma wurden bei wenigen Probanden positive Testreaktionen detektiert nach Inkubation der PBMC ohne Amantadin und Antigen, was die Zugabe von Amantadin gering veränderte.

Und auch bei den Antigenen bewirkte die Zugabe von Amantadin nur geringe Veränderungen der Messwerte bei den „Non-Respondern“, sodass bei den PBMC weniger Probanden der Grenzwert für TNF-beta und IFN-gamma überschritten wurde. Die IFN-gamma-Produktion wurde bei Verwendung von Amantadin ohne Kostimulation und bei Kostimulation mit BCG, Tetanol und PPD im mittleren Konzentrationsbereich inhibiert.

Ohne bzw. mit Antigen exprimierten die PBMC der Mehrheit der Probanden die TH<sub>2</sub>-typischen Zytokine IL-5 und IL-13, was sich nach Zugabe von Amantadin noch geringfügig erhöhte. Die IL-5-Produktion wurde bei den hohen Konzentrationen von Amantadin ohne Kostimulation signifikant inhibiert. Ebenso kam es zu einer Inhibierung der IL-13-Produktion nach Kostimulation

mit Amantadin und BCG bzw. Tetanol in niedrigen bis mittleren bzw. hohen Konzentrationen.

Wie bei Ribavirin überschritten die PBMC ohne Antigen und Amantadin bei der Hälfte der Probanden den Grenzwert, ab dem der Nachweis von IL-10 als positiv gilt. Die Zugabe von Amantadin bewirkte hier ebenfalls eine Zunahme der Messwerte bei den PBMC einiger „Non-Responder“. Im mittleren Verdünnungsbereich kam es wie bei Ribavirin nach Kostimulation mit Amantadin und BCG zu einer signifikanten Inhibierung der IL-10-Produktion.

Beim Nachweis von GM-CSF reagierten die PBMC ohne Antigen und Amantadin bei der Hälfte der Probanden positiv. Die Zugabe von Amantadin konnte die Messwerte bei Testung der PBMC ohne Antigen und mit Antigen nur gering verändern. Die GM-CSF-Produktion wurde durch Amantadin ohne Kostimulans und bei Kostimulation mit BCG in hoher Konzentration, bei Kostimulation mit Tetanol in niedriger Konzentration und bei Kostimulation mit PPD in mittlerer und hoher Konzentration von Amantadin signifikant inhibiert.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden (LTT, Durchflusszytometrie und Zytokin-ELISA) sind standardisierte Testverfahren, die bereits lange in der klinischen Routine Anwendung finden. Auch im Immunpathologischen Labor des Universitätsklinikums Tübingen bestehen mit diesen Methoden jahrelange Erfahrungen<sup>126</sup>. Monozyten können durch diverse Einflüsse aktiviert werden und somit auch die Zytokinbildung beeinflusst werden. Hierzu zählen beispielsweise Stressreaktionen, Alkoholkonsum, Ernährung oder Übermüdung. Solche physiologischen Einflüsse sind schwer kontrollierbar und können die Messungen beeinflussen. Deswegen wurden nur gesunde Probanden eingeschlossen, bei denen keine schwerwiegende Krankheit vorlag und die zuvor keinen Alkohol konsumiert hatten. So sollte eine Beeinflussung des Immunsystems durch eine Erkrankung oder Alkoholkonsum ausgeschlossen werden. Die Vollblutproben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und rasch weiterverarbeitet, um lagerungsbedingte Veränderungen zu vermeiden. Weiterhin kann der Kontakt mit Fremdmaterialien zu einer Aktivierung der Leukozyten führen und Monozyten durch Adhärenz an Oberflächen (z. B. Plastikpetrischalen oder Glas) für Analysen verloren gehen<sup>127</sup>.

Da eine Kontamination der Proben eventuell zu einer Aktivierung der zu untersuchenden Zellen führen und damit das Zytokinprofil beeinflusst werden kann, wurde unter einer Sterilbank gearbeitet.

#### **4.1.1 Proliferationsassay**

Der Lymphozytentransformationstest (LTT) misst die Stimulierbarkeit von Lymphozyten auf unspezifische (Mitogene) und spezifische Reize (Antigene). Mit seiner Hilfe kann daher nur die Sensibilisierungsphase, nicht aber die Effektorreaktion nachgewiesen werden. Indikationen für den LTT sind – wie

auch 2008 vom Robert Koch Institut in einer aktualisierten Bewertung des LTT-Verfahrens betont – z. B. hereditäre und erworbene zelluläre Immundefekte, Beurteilung immunstimulierender oder immunsuppressiver Therapien, Differenzierung exogener (z. B. toxischer) und endogener Lymphozytendefekte, sowie der Nachweis einer zellulären Sensibilisierung gegen Arzneimittel.

Trotz umfangreicher Literatur zur diagnostischen Wertigkeit des LTT wird der Test auch derzeit von verschiedenen Experten skeptisch beurteilt<sup>128</sup>.

Der LTT ist ein biologischer Test mit hoher Variabilität. So unterscheiden sich beispielsweise die Thymidineinbauraten von unterschiedlichen Patienten stark, ebenso die Steigerung durch unspezifische Stimulanzen. Dies kann teilweise dadurch erklärt werden, dass ein geringer und unterschiedlicher Anteil der Lymphozyten im Kulturansatz allergenspezifisch ist. Je nach deren Anzahl beim einzelnen Patienten und der Anwesenheit von stimulierenden und hemmenden Faktoren kann der SI sehr unterschiedlich ausfallen<sup>129</sup>. Wie bei anderen Allergietests können auch beim LTT trotz „lege artis“ Durchführung wegen der biologischen Variabilität falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auftreten. Zudem können die Ergebnisse artifiziell positiv werden, wenn durch zu hohe Allergenkonzentrationen die Proliferation von Lymphozyten unspezifisch stimuliert wird. Mit fehlerhaften Ergebnissen ist zudem zu rechnen, wenn im durchführenden Labor keine ausreichende Erfahrung mit der Zellkultur vorliegt, die Durchführung des Tests nicht leitliniengerecht erfolgt und keine Qualitätssicherungsmaßnahmen vorliegen. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Test sehr personalintensiv, zeitaufwändig, störanfällig und somit auch kostenintensiv ist. Ein grundsätzliches Problem ist, dass es keine einheitlichen vitalen Lymphozyten-Präparate in größeren Mengen gibt und damit keine Ringversuche durchführbar sind, was die Möglichkeit einer Standardisierung ziemlich begrenzt.

In der vom Robert Koch Institut aktualisierten Bewertung des LTT-Verfahrens werden dem Test Vorteile hinsichtlich Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum Epikutantest zuerkannt unter der Voraussetzung, dass gewisse Qualitätsaspekte beachtet werden<sup>130</sup>. Betont wird, dass der Test nicht geeignet ist zum Nachweis einer allergischen Reaktion gegenüber Nahrungsmitteln,

Pollen, Hausstaub etc., Metallen, Pestiziden, Kosmetika, oder dem Nachweis einer Infektion (z. B. Borreliose).

#### **4.1.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung zellulärer und partikulärer Bestandteile. Partikel, die im FACS gemessen werden können, sind beispielsweise Blutzellen, Tumorzellen, Pflanzenzellen, Protoplasten, Bakterien, Hefen und Viren. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Der große Vorteil gegenüber dem Immunfluoreszenztest besteht in der Erfassung großer Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit. Mit der Durchflusszytometrie können gleichzeitig zwei morphologische und vier oder mehr Fluoreszenzparameter je Zelle (d. h. mindestens sechs Parameter pro Zelle) erfasst werden. Durch die Computeranalyse ist eine Typisierung von Subpopulationen möglich.

Ein Nachteil besteht in der zeitlich begrenzten Untersuchbarkeit der Zellpräparation und den Kosten für die Fluorchrom-gekoppelten Antikörper. Da sich Antikörper auch unspezifisch an andere Zellen binden können und einige Zellen eine Eigenfluoreszenz aufweisen, sollten in den Testreihen immer parallel Isotypenkontrollen durchgeführt werden, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern.

#### **4.1.3 Zytokin-ELISA**

Mithilfe des Sandwich-ELISA können Antigene quantitativ bestimmt werden, die zwischen zwei Lagen von Antikörpern binden. Hierzu muss das Antigen mindestens zwei Antigenbindungsstellen aufweisen, an die zwei verschiedene Antikörper binden können. Die beiden Antikörper sollten nicht zu denselben Epitopen des Antigens passen, weswegen nicht alle Antikörper für diese Methode geeignet sind. Vorteilhaft ist hingegen, dass dadurch die Spezifität höher ist, da die zur Detektion verwendeten Antikörper gegen mindestens zwei verschiedene Epitope des Analyten gerichtet sind und somit auch Proben mit



geringe Antigenkonzentration oder durch andere Antigene verschmutzte Proben ohne Aufreinigung sicher untersucht werden können.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Proliferationsassay**

In dieser Arbeit ergaben die Ergebnisse des Proliferationsassays, dass bei einer Stichprobe von 20 gesunden Probanden Ribavirin alleine über keine signifikante immunmodulierende Potenz verfügte und auch die Zugabe des Antigens PPD zu keiner signifikanten Stimulierung oder Inhibierung der PBMC führte, wenngleich das Proliferationsverhalten der PBMC bei einigen Probanden deutlich angeregt wurde.

PPD hatte die schwächste immunmodulierende Wirkung auf die PBMC. Diese schwachen Reaktionen können dadurch begründet werden, dass unter den 20 Probanden anhand des Zytokinprofils nur drei TH<sub>1</sub>-Responder aufzufinden waren, wobei zwei der drei TH<sub>1</sub>-Responder ebenfalls keine Reaktionen auf Ribavirin und Amantadin unter Hinzugabe von PPD zeigten. Ribavirin wirkte bei Kostimulation durch BCG und Tetanol in höheren Konzentrationen inhibitorisch auf die PBMC der meisten Probanden.

Bekannt ist, dass das Antigen BCG die Makrophagenproliferation stimuliert. Bei den Zellen der untersuchten Probanden erzielte BCG ohne Kostimulation durch Ribavirin höhere Stimulationsindices als mit Kostimulation durch Ribavirin und in den Lymphozytenüberständen der meisten Probanden kam es zu einer positiven Testreaktion. Die Zugabe von Ribavirin bewirkte keine wesentliche Zunahme der Proliferation, sondern wirkte in zunehmender Konzentration bei fast allen Probanden inhibitorisch auf die PBMC. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass BCG und Ribavirin auf ähnliche Weise wirken und BCG das stärker wirkende Agens ist, sodass die Zugabe von Ribavirin keinen wesentlichen Effekt mehr bezüglich der Aktivierung hervorrufen kann.

Auch Amantadin zeigte ohne Hinzugabe eines Kostimulans keine signifikante immunstimulierende Wirkung, was auch die Hinzunahme von Tetanol und PPD nicht änderte. Lediglich durch Kostimulation der Zellen mit Amantadin und BCG

fürte im mittleren Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Stimulierung der PBMC.

#### 4.2.2 Durchflusszytometrie

Als frühes Aktivierungsgen (0,5 bis 48 Stunden) wird CD69 sowohl von T-Lymphozyten als auch von NK- und B-Zellen bei deren Aktivierung exprimiert. Somit eignet sich CD69 als Marker für früh ablaufende Aktivierungsreaktionen spezifischer Immunzellen. Da das Proliferationsverhalten der PBMC erst nach sieben Tagen gemessen wurde, besteht kein unbedingter Zusammenhang zwischen einer CD69-Expression und einem verstärkten Proliferationsverhalten der immunkompetenten Zellen. Dennoch war zu beobachten, dass bei der Kostimulation der PBMC mit Ribavirin und den Antigenen BCG, Tetanol und PPD hohe SI-Werte der PBMC im Proliferationsassay bei einigen Probanden mit hohen Messwerten in der durchflusszytometrischen Analyse korrelierten.

Ribavirin bewirkte ohne Kostimulans eine signifikante Aktivierung der CD4- und CD19-positiven Zellen. Es ist bekannt, dass eine früh einsetzende und zudem multispezifische Reaktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nötig ist, um eine Ausheilung der Hepatitis C bewirken zu können. Aktuellste Studien haben herausgefunden, dass bei chronisch infizierten Patienten meist (CD19 positive) B-Zellen mit HCV assoziiert sind<sup>131</sup>. Stimulierte, intakte B-Zellen könnten einer chronischen Infektion entgegenwirken.

Im Durchschnitt reagierten die CD4-positiven Zellen am geringsten und die CD8- und teilweise die CD56-positiven Zellen am stärksten, was einer Aktivierung von zytotoxischen und NK-Zellen entspricht und somit im Rahmen einer antiviralen Therapie erwünscht wäre.

Bei chronisch Hepatitis C-Infizierten zeigen sich häufig extrahepatische Krankheitsmanifestationen. Dieser Mechanismus ist nicht komplett verstanden und zudem umstritten<sup>132</sup>. Es wird diskutiert, ob spezifische NK-Zellen bei einer HCV-Infektion hoch- oder runterreguliert werden und es bleibt unklar, welche genaue Funktion NK-Zellen haben<sup>133, 134, 135</sup>. Bei HIV(+) Patientin wurde bereits eine NK-Zell-Aktivierung im Rahmen einer akuten HCV-Infektion festgestellt. Hierbei sezernierten die NK-Zellen IFN- $\gamma$  und *in vitro* konnte gezeigt werden,

dass die HCV-Replikation hierdurch gehemmt wurde. Hierbei verfügten Spontanausheiler über eine stärkere IFN- $\gamma$ -Ausschüttung als Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion<sup>136</sup>.

Durch Inkubation von Ribavirin mit dem Makrophagen-aktivierenden BCG wurden CD4- positive Zellen (u. a. Makrophagen) signifikant aktiviert, wohingegen CD8-positive Zellen (zytotoxische Zellen) signifikant inhibiert wurden, was der Suppression der PBMC-Produktion im Proliferationsassay entsprach. Eine CD4-Zellaktivierung im Rahmen einer akuten Hepatitis-C-Infektion wäre wünschenswert, da dies eine Ausheilung bewirken kann.

Die Kostimulation mit Ribavirin und Tetanol bewirkte eine signifikante Abnahme der Aktivierung von CD19- bzw. CD56-positive Zellen. Chronisch infizierte Hepatitis C-Patienten weisen oftmals erhöhte Level von funktionell geschädigten NK-Zellen auf. Dies korreliert mit einem Behandlungsversagen auf eine Therapie mit peg-IFN- $\alpha$  und Ribavirin<sup>137</sup>. Eine Hemmung dieser NK-Zellen könnte die Interaktion zwischen HCV und Lymphozyten stören und die HCV assoziierte Immundysfunktion wiederherstellen oder eine erneute Infektion verhindern.

Ähnlich wie bei Ribavirin konnte man auch bei der Stimulierung der PBMC durch Amantadin in Kombination mit den Antigenen BCG, Tetanol und PPD eine Parallele zwischen den Ergebnissen des Proliferationsassay und der durchflusszytometrischen Analyse erkennen. Es kam zu keinen signifikanten Stimulierungen.

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der PBMC im Proliferationsassay und in der Durchflusszytometrie, dass sowohl Ribavirin als auch Amantadin über einen immunmodulierenden Effekt auf PBMC verfügen, jedoch ergaben sich keine klar richtungsweisenden Ergebnisse in dieser Testreihe. In dieser Arbeit wurde eine kleine Probandenkohorte untersucht, in der sowohl TH<sub>1</sub>- als auch TH<sub>2</sub>- und TH<sub>0</sub>-Immunprofile vertreten waren. Möglicherweise wäre die alleinige Untersuchung eines größeren Kollektives der jeweiligen Subtypen eine

Möglichkeit, um die genaueren immunmodulierenden Wirkmechanismen zu untersuchen.

### 4.2.3 Zytokin-ELISA

Typ TH<sub>1</sub>-Zellen bilden v.a. die Zytokine IFN-gamma und TNF-beta und sind bei der Makrophagenaktivierung sowie verzögerten Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt. Im Gegensatz dazu produzieren Typ TH<sub>2</sub>-Zellen führend IL-5 sowie IL-13 und vermitteln Antikörperantworten. Diese T-Helferzellen-Untergruppierungen repräsentieren polarisierte Arten der spezifischen Immunantwort und wirken gegensätzlich. Sie sind eng mit der Resistenz gegen bakterielle Infektionen assoziiert und ebenso in die Induktion und Regulierung der Autoimmunantworten und Überempfindlichkeitsreaktionen involviert. Bei vielen chronischen Erkrankungen besteht eine Imbalance der T-Zell-Subpopulationen.

Wird diese TH<sub>1</sub>-/TH<sub>2</sub>-Balanz zu Beginn einer Infektion mit Hepatitis C in Richtung Typ-2-Reaktion polarisiert, kann die Typ-1-Reaktion supprimiert werden und das innere Milieu wird eine virale Persistenz begünstigen, da keine neutralisierenden Antikörper gebildet werden konnten<sup>138</sup>.

Durch die Bestimmung des TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> -Zytokinprofils lassen sich selektive Defekte detektieren und insbesondere die aktuell bestehende TH-Balance ermitteln, was die weiteren Therapieoptionen wesentlich beeinflussen kann.

Die Definition einer Typ-1- oder Typ-2-Reaktion basiert v. a. auf der Ausschüttung von Lymphozyten aus dem Zielorgan oder auf der Produktion von entsprechenden Zytokinen als Antwort auf ein spezifisches Antigen *in vitro*<sup>139,140,141</sup>.

Wie aus einer Studie aus unserem Labor bekannt ist, wird ein Typ-1-Profil durch eine positive IFN-gamma- und/ oder TNF-beta-Produktion nach Stimulierung der PBMC durch PPD, aber keine Zytokinproduktion nach Tetanol-Stimulierung, definiert. Im Gegensatz dazu ist ein Typ-2-Profil dadurch charakterisiert, dass die PBMC nach Stimulierung durch Tetanol IL-4, IL-5 und/ oder IL-13 ausschütten und nicht auf PPD reagieren, wobei bezüglich des Typ-2-Profiles unterschiedliche Studienvorliegen. Ein sogenannter Mischtyp (Typ-

1/Typ-2-Profil, TH<sub>0</sub>-Typ) liegt bei gleichzeitiger Reaktion der Zellen gegenüber PPD und Tetanol vor<sup>142</sup>.

In dieser Arbeit wurden PBMC mit dem Typ-1-spezifischen Antigen PPD und dem Typ-2-spezifischen Antigen Tetanol inkubiert und die Typ-1-relevanten Zytokine IFN-gamma und TNF-beta bzw. die Typ-2-relevanten Zytokine IL-5 und IL-13 in den Lymphozytenüberständen gemessen.

#### **4.2.3.1 Einfluss von Ribavirin auf die Zytokinproduktion**

Betrachten wir zunächst die Wirkung von Ribavirin auf das Zytokinprofil der PBMC.

In dieser Arbeit bewirkte Ribavirin alleine sowie im Makrophagen-typischen Milieu keine signifikante Stimulierung oder Inhibierung der PBMC bezüglich der Ausschüttung der Makrophagen-typischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-alpha.

Nach Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und Tetanol kam es im mittleren Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Supprimierung der IL-1- und IL-6-Produktion, wohingegen höhere Ribavirinkonzentrationen eine signifikante Stimulierung der IL-6- und TNF-alpha-Produktion bewirkten.

Das TH<sub>1</sub>-typische Zytokin TNF-beta wurde nach Kostimulation mit Ribavirin und BCG, Tetanol und PPD signifikant geringer ausgeschüttet. Die IFN-gamma-Bildung wurde nach Zugabe von Ribavirin alleine und durch Kostimulation mit Tetanol signifikant supprimiert.

Dies widerspricht vielen Studien, in denen Ribavirin einen Shift von TH<sub>2</sub>- zu TH<sub>1</sub>-vermittelter Immunantwort bewirken konnte, indem CD4<sup>+</sup>-Zellen herunterreguliert wurden und dadurch der IL-10-Spiegel fiel, sprich die TH<sub>2</sub>-Zytokinausschüttung abnahm<sup>143,144</sup>, was daran liegen könnte, dass unter den Probanden unserer Studie lediglich drei TH<sub>1</sub>-Typen befanden. Diese reagierten größtenteils mit einer vermehrten IFN-gamma-Ausschüttung nach Zugabe von Ribavirin alleine und in Kombination mit den drei Kostimulantien. Die meisten Probanden (neun) entsprachen bezüglich des Immunprofiles einem TH<sub>2</sub>-Typen und weitere acht Probanden einem TH<sub>0</sub>-Typen. Unter den TH<sub>0</sub>-Typen zeigte sich bei einigen Probanden eine Tendenz zur Aktivierung der TH<sub>1</sub>-vermittelten Immunantwort in Form einer vermehrten TNF-beta- und IFN-gamma-

Ausschüttung nach Hinzugabe von Ribavirin. Die Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht relevant.

Eine Typ-1-Zytokinantwort ist wichtig in der frühen Phase der Virusinfektion mit dem Ziel, die Infektion zu kontrollieren. Wenn CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu Typ-2-T-Zellen meist spät während der Virusinfektion differenzieren, produzieren sie IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 und IL-10, unterstützen die humorale Immunantwort und limitieren bzw. kontrollieren die Typ-1-Reaktion des Wirtes. Normalerweise dient diese Typ-2-Reaktion dazu, den Wirt vor einer andauernden inflammatorischen T-Zell-vermittelten Typ-1-Immunantwort zu schützen und für eine lang andauernde humorale Immunität zu sorgen. Weiterhin wurde eine reduzierte Anzahl von PBMC mit Typ-1-Zytokinprofil bei Patienten entdeckt, die eine persistierende HCV-Virämie aufwiesen, verglichen mit Patienten mit selbstlimitierender HCV-Infektion<sup>145</sup>. Zudem zeigten Patienten mit chronischer HCV-Infektion eine reduzierte Kapazität der HCV NS3 antigen-spezifischen T-Zellen IL-2 zu produzieren<sup>146</sup>.

Das Ausschüttungsverhalten der TH<sub>2</sub>-typischen Zytokine IL-5 und IL-13 wies Parallelen zur bisherigen Studienlage auf<sup>143,144</sup>. So wurde die IL-5-Produktion durch die Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und BCG bzw. Tetanol signifikant inhibiert. Ebenso wurde die IL-13-Sezernierung nach Stimulierung der Zellen mit Ribavirin alleine sowie nach Kostimulation mit Ribavirin und BCG bzw. Tetanol signifikant inhibiert.

IL-10 wird von regulatorischen T-Zellen sezerniert. Es hemmt die Wirkung aktivierter T-Zellen und bremst damit die Produktion von Interferon-gamma, weswegen es auch als TH<sub>2</sub>-typisches Zytokin bezeichnet werden kann. In dieser Arbeit wurde die IL-10-Ausschüttung durch Kostimulation der Zellen mit Ribavirin und BCG signifikant reduziert, was wie oben bereits erwähnt mit der allgemeinen Studienlage übereinstimmt, dass Ribavirin zu einer Hemmung der TH<sub>2</sub>-Zytokine führen kann.

Bisherige Studien zeigten, dass BCG im Tiermodell, aber auch beim Menschen bei Makrophagen *in vitro* eine Ausschüttung von TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-10, IL-12 und IL-18 hervorrufen kann<sup>147,148,149</sup>. Die Zunahme der

Ausschüttung der Makrophagen-typischen Zytokine durch PBMC konnte auch in dieser Arbeit bei alleiniger Stimulierung der PBMC mit BCG beobachtet werden.

#### **4.3.2.2 Einfluss von Amantadin auf die Zytokinproduktion**

Im Folgenden soll die Wirkung von Amantadin auf immunkompetente Zellen genauer betrachtet werden. Es zeigte sich bei den Makrophagen-typischen Zytokinen IL-1 und IL-6 wie bei Ribavirin eine signifikante Inhibierung nach Kostimulation der PBMC mit Amantadin und Tetanol. Weiterhin wurde die IL-6-Produktion durch Kostimulation mit Amantadin und PPD signifikant supprimiert. Nach Stimulierung mit Tetanol kam es zu einer signifikanten Stimulierung der TNF-alpha-Produktion.

Die Testung der TH<sub>1</sub>-typischen Zytokine TNF-beta und IFN-gamma ergab lediglich in den Testreihen mit IFN-gamma signifikante Ergebnisse, und zwar wurde die IFN-gamma-Produktion bei Verwendung von Amantadin ohne Kostimulans und mit den Kostimulantien BCG, Tetanol sowie PPD inhibiert, was mit Studien übereinstimmt, in welchen Amantadin die IFN-gamma- und TNF-alpha-Produktion reduzierte und die IL-10-Produktion erhöhte<sup>150,151</sup>. Studien mit Parkinsonpatienten zeigten wiederum, dass vor der Behandlung mit Amantadin die IL-2- und IFN-gamma-Spiegel merklich reduziert waren im Vergleich zu Kontrollen bei Probanden mit Depression und bei Gesunden. Nach Amantadinbehandlung wurde der IL-2-Sekretionsmangel *in vitro* bei der Hälfte der Patienten auf normale Level berichtigt und der IL-2-Anstieg korrelierte mit einem Anstieg der IFN-gamma-Sekretion<sup>152</sup>. Weiterhin zeigte eine Studie mit Parkinsonpatienten, dass eine Kurzzeitbehandlung mit Amantadin mit einem Anstieg des CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses verbunden war, was ein verbessertes T-Zell-vermitteltes Immunsystem anzeigen könnte<sup>153</sup>. Die Ergebnisse passen zu dem Befund anderer Studien mit an Parkinson erkrankten Patienten, in denen es zu einem Mitogen-induzierbaren Anstieg der IL-2-Sekretion aufgrund von Amantadin kam, da CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen die hauptsächlich IL-2-produzierenden T-Zellen sind<sup>154</sup>. Es wurde

herausgefunden, dass Amantadin bei Parkinsonpatienten zu höheren CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Leveln führt und somit das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis ansteigt.

Eine IL-2- sowie IFN-gamma-Produktion weist auf eine TH<sub>1</sub>-Aktivierung hin. Diese TH<sub>1</sub>-Aktivierung ist widersprüchlich zu den oben genannten Ergebnissen, was dadurch erklärt werden könnte, dass in unserer Kohorte gesunde Probanden ohne (bekannte) Immunschwäche oder chronische Erkrankung untersucht wurden und Amantadin auf die TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>-Balance bei Erkrankten möglicherweise einen anderen Effekt hat als bei Gesunden. Ein anderer Grund für die abweichenden Ergebnisse in unserer Untersuchung könnte auch sein, dass sich in unserer Kohorte nur drei TH<sub>1</sub>-Responder befanden.

Die TH<sub>2</sub>-typischen Zytokinen IL-5, IL-13 und IL-10 zeigten in den folgenden Konstellationen signifikante Veränderungen: Hohe Konzentrationen von Amantadin ohne Kostimulation führten zu einer Inhibierung der IL-5-Ausschüttung. Ebenso kam es zu einer Inhibierung der IL-13-Produktion nach Kostimulation der Zellen mit Amantadin und BCG bzw. Tetanol. Die IL-10-Produktion wurde nach Kostimulation mit Amantadin und BCG signifikant inhibiert.

Versuche bei Ratten hatten bereits gezeigt, dass Amantadin die Produktion des negativen Immunregulators IL-10 in Ratten fördert<sup>155</sup>, was unseren Messungen mit PBMC vom Menschen widerspricht.

Im Vergleich mit anderen Studienergebnissen gilt es allgemein zu beachten, dass in dieser Studie die meisten Probanden (17) einem TH<sub>0</sub>- und TH<sub>2</sub>-Typ entsprachen und es in einer größeren Kohorte oder bei einem Überwiegen eines anderen Subtyps die Ergebnisse deutlich variieren könnten.



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ribavirin wurde als eines der ältesten Virostatika zuletzt v.a. zur Therapie der chronischen Hepatitis C verwendet. Sein genauer Wirkungsmechanismus ist aber unbekannt.

Es scheint, dass Ribavirin über keine antivirale Wirkung im Sinne einer direkten Hemmung der HCV-Replikation verfügt, sondern über die Freisetzung verschiedener Zytokine einen Shift von TH<sub>2</sub>- zu TH<sub>1</sub>-vermittelter Immunreaktion auslöst.

Amantadin wurde zur Behandlung diverser Erkrankungen einschließlich der Prophylaxe einer Influenza eingesetzt. Bei der Therapie der Hepatitis C wurde es mit Ribavirin kombiniert, um dessen Effekt zu verstärken. Sein Stellenwert in der Hepatitis-C-Therapie blieb aber umstritten. Bisher liegen nur wenige Studien vor, die den immunmodulierenden Effekt von Amantadin untersucht haben. Vereinzelt wurde eine Inhibierung der HCV-Replikation durch Amantadin bei an Hepatitis C erkrankten Patienten *in vivo* und *in vitro* beschrieben, der genaue antivirale Wirkmechanismus von Amantadin in der HCV-Therapie blieb aber bis zuletzt unbekannt.

Beide Medikamente werden derzeit bezüglich einer Wirksamkeit zur Therapie einer Covid-19-Erkrankung untersucht.

PBMC von 20 gesunden Probanden wurden *in vitro* kultiviert, um dann sowohl Zellen des erworbenen Immunsystems als auch Natürliche Killerzellen genauer zu untersuchen. Hierbei sollten insbesondere TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Reaktionen analysiert werden. Drei verschiedene Antigene (BCG, Tetanus-Toxoid und PPD) wurden verwendet, um die PBMC zu unterschiedlichen Immunreaktionen vom TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-Typ anzuregen; ferner wurde der Einfluss von Ribavirin bzw. Amantadin in unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb dieses *in vitro*-Testsystems untersucht. Ein radioaktiver Proliferationsassay diente der quantitativen Zellproliferationsbestimmung. Die Ausbildung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie verschiedener Zelloberflächenmoleküle (CD4, CD8, CD19 und CD56) wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Ein

Zytokin-ELISA diente der Untersuchung der Zytokinproduktion (IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-gamma, TNF-alpha, TNF-beta und GM-CSF) unter Einfluss von Ribavirin bzw. Amantadin.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass es große interindividuelle Unterschiede in der immunologischen Reaktion auf Ribavirin und Amantadin gibt. So zeigten einige der 20 Probanden ähnliche Ansprechverhalten auf beide Wirkstoffe, welche aber in der gesamten Kohorte nicht signifikant waren. Dies erklärt auch, warum die Therapie der Hepatitis C mit diesen Substanzen nur einen marginalen Effekt hatte.

In dieser Arbeit wurde eine kleine Probandenkohorte untersucht, in der sowohl TH<sub>1</sub>- als auch TH<sub>2</sub>- und TH<sub>0</sub>-Immunprofile vertreten waren. Die Untersuchung eines größeren Kollektives der jeweiligen Subtypen wäre eine Möglichkeit, um die immunmodulierenden Wirkmechanismen genauer zu verstehen und dann mögliche Therapieresponder von Non-Respondern zu unterscheiden bzw. Ansatzpunkte für künftige Therapien zu ermitteln.

Individuelle Prädisposition und immunologische Reaktionsmuster könnten also wichtige Faktoren sein, welche die Wirksamkeit von Ribavirin und Amantadin beeinflussen. Möglicherweise könnte eine prätherapeutische Bestimmung des jeweiligen immunologischen Subtyps helfen, eine auf den Patienten optimal angepasste antivirale Therapie auszuwählen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytokin-übermittelte Differenzierung zu TH1/ TH2-Zellen.....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung des optischen Systems des BD FACSCaliburTM .....	24
Abbildung 3: Streulicht-Dot-Plot (schematische und reale Darstellung) .....	26
Abbildung 4: Gating (Schleusen) .....	26
Abbildung 5: Ribavirin (Strukturformel) .....	28
Abbildung 6: (A) Modell der Basenpaarungsmöglichkeiten von Ribavirintriphosphat mit Cytidin oder nach Rotation der Carboxamidgruppe- mit Uridin14.(B) Induktion von Hypermutationen bei einem Plusstrang-RNA-Virus (z. B. HCV). .....	31
Abbildung 7: Amantadin (Strukturformel) .....	35
Abbildung 8: PBMC-Isolierung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	44
Abbildung 9: Proliferative Wirkung von Ribavirin auf PBMC an den Tagen 3, 5 und 7 .....	51
Abbildung 10: Proliferative Wirkung von Amantadin auf PBMC an den Tagen 3, 5 und 7.....	51
Abbildung 11: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation .....	52
Abbildung 12: Wirkung von Ribavirin bei Kostimulation mit BCG .....	53
Abbildung 13: Wirkung von Ribavirin bei Kostimulation mit Tetanol.....	54
Abbildung 14: Wirkung von Ribavirin bei Kostimulation mit PPD .....	55
Abbildung 15: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation .....	56
Abbildung 16: Wirkung von Amantadin bei Kostimulation mit BCG.....	57
Abbildung 17: Wirkung von Amantadin bei Kostimulation mit Tetanol .....	58
Abbildung 18: Wirkung von Amantadin bei Kostimulation mit PPD.....	59
Abbildung 19: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen .....	61
Abbildung 20: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen .....	62
Abbildung 21: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen .....	62
Abbildung 22: Wirkung von Ribavirin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69- Expression) CD56-positiver Zellen.....	63
Abbildung 23: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	64
Abbildung 24: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	65
Abbildung 25: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	65
Abbildung 26: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	66
Abbildung 27: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	67
Abbildung 28: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	67
Abbildung 29: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	68
Abbildung 30: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	68
Abbildung 31: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	69

Abbildung 32: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	70
Abbildung 33: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD.....	70
Abbildung 34: Wirkung von Ribavirin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	71
Abbildung 35: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen .....	72
Abbildung 36: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen.....	72
Abbildung 37: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen .....	73
Abbildung 38: Wirkung von Amantadin ohne Kostimulation auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen .....	73
Abbildung 39: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	74
Abbildung 40: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	75
Abbildung 41: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	75
Abbildung 42: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit BCG .....	76
Abbildung 43: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	77
Abbildung 44: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	77
Abbildung 45: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	78
Abbildung 46: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit Tetanol.....	78
Abbildung 47: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD4-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	79
Abbildung 48: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD8-positiver nach Kostimulation mit PPD .....	80
Abbildung 49: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD19-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	80
Abbildung 50: Wirkung von Amantadin auf die Aktivierung (CD69-Expression) CD56-positiver Zellen nach Kostimulation mit PPD .....	81
Abbildung 51: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	84
Abbildung 52: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG.....	85
Abbildung 53: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	85
Abbildung 54: Wirkung von Ribavirin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	86
Abbildung 55: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	86
Abbildung 56: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG.....	87

Abbildung 57: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	87
Abbildung 58: Wirkung von Ribavirin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	88
Abbildung 59: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	88
Abbildung 60: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	89
Abbildung 61: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	89
Abbildung 62: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	90
Abbildung 63: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	91
Abbildung 64: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	92
Abbildung 65: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	92
Abbildung 66: Wirkung von Ribavirin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	93
Abbildung 67: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	93
Abbildung 68: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	94
Abbildung 69: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	94
Abbildung 70: Wirkung von Ribavirin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	95
Abbildung 71: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	96
Abbildung 72: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	97
Abbildung 73: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	97
Abbildung 74: Wirkung von Ribavirin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	98
Abbildung 75: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	98
Abbildung 76: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	99
Abbildung 77: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	99
Abbildung 78: Wirkung von Ribavirin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	100
Abbildung 79: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	101
Abbildung 80: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	101
Abbildung 81: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	102

Abbildung 82: Wirkung von Ribavirin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	102
Abbildung 83: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	103
Abbildung 84: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	104
Abbildung 85: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch nach Kostimulation mit Tetanol.....	104
Abbildung 86: Wirkung von Ribavirin auf die GM-CSF-Produktion durch nach Kostimulation mit PPD .....	105
Abbildung 87: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	107
Abbildung 88: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG.....	107
Abbildung 89: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	108
Abbildung 90: Wirkung von Amantadin auf die IL-1-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	108
Abbildung 91: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	109
Abbildung 92: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG.....	109
Abbildung 93: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	110
Abbildung 94: Wirkung von Amantadin auf die IL-6-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	110
Abbildung 95: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	111
Abbildung 96: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	111
Abbildung 97: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol.....	112
Abbildung 98: Wirkung von Amantadin auf die TNF-alpha-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD.....	112
Abbildung 99: Wirkung von Amantadin auf die TNF-beta-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	114
Abbildung 100: Wirkung von Amantadin auf die TNF- beta -Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	114
Abbildung 101: Wirkung von Amantadin auf die TNF-beta -Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol.....	115
Abbildung 102: Wirkung von Amantadin auf die TNF- beta-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD.....	115
Abbildung 103: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	116
Abbildung 104: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	116
Abbildung 105: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma--Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol.....	117
Abbildung 106: Wirkung von Amantadin auf die IFN-gamma--Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD.....	117

Abbildung 107: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	119
Abbildung 108: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	120
Abbildung 109: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	120
Abbildung 110: Wirkung von Amantadin auf die IL-5-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	121
Abbildung 111: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	121
Abbildung 112: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	122
Abbildung 113: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	122
Abbildung 114: Wirkung von Amantadin auf die IL-13-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	123
Abbildung 115: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	124
Abbildung 116: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	124
Abbildung 117: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	125
Abbildung 118: Wirkung von Amantadin auf die IL-10-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	125
Abbildung 119: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC ohne Kostimulation .....	126
Abbildung 120: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit BCG .....	127
Abbildung 121: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit Tetanol .....	127
Abbildung 122: Wirkung von Amantadin auf die GM-CSF-Produktion durch PBMC nach Kostimulation mit PPD .....	128

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Cluster of Differentiation (Auswahl).....	16
Tabelle 2: Übersicht über wichtige Zytokine des Immunsystems.....	19
Tabelle 3: Stärke der HCV-spezifischen Immunantwort nach Manns et al. 2006.....	21
Tabelle 4: Verwendete Fluorochromkonjugate mit dazugehörigen Anregungs- und Emissionsspektren.....	25
Tabelle 5: Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut.....	39
Tabelle 6: Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT).....	40
Tabelle 7: Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie.....	40
Tabelle 8: Antikörper für die FACS-Analyse.....	40
Tabelle 9: Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-ELISA.....	41
Tabelle 10: Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-ELISA.....	41
Tabelle 11: Antikörper für den Zytokin-ELISA.....	41
Tabelle 12: Antigene.....	42
Tabelle 13: Medikamente.....	42
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	43
Tabelle 15: Konzentrationen der gereinigten monoklonalen anti-human Zytokin Antikörper ..	49
Tabelle 16: Konzentrationen der rekombinanten human Zytokin Standards.....	49
Tabelle 17: Konzentrationen der biotinylierten monoklonalen anti-human Zytokin Antikörper	49
Tabelle 18: Definierte Zytokingrenzwerte in pg/ml.....	49



## Literaturverzeichnis

---

- <sup>1</sup> Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- <sup>2</sup> Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989; 244(4902):362-4.
- <sup>3</sup> Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244(4902):359-62.
- <sup>4</sup> An der Heiden M, Ritter S, Hamouda O et al. (2015) Estimating the residual risk for HIV, HCV and HBV in different types of platelet concentrates in Germany. *Vox Sang* 108(2):123-130.
- <sup>5</sup> Smith DB, Bukh J, Kuiken C et al.: Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014;59(1):318– 327.
- <sup>6</sup> Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol*. 1997; 26(3):484-91.
- <sup>7</sup> Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol*. 1999; 31 Suppl 1:65-70.
- <sup>8</sup> Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*. 1997; 25(3):754-8.
- <sup>9</sup> Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1997; 26(3 Suppl 1):34S-38S.
- <sup>10</sup> Nagayama K, Kurosaki M, Enomoto N, Miyasaka Y, Marumo F, Sato C. Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression. *Hepatology*. 2000; 31(3):745-50.
- <sup>11</sup> Diodati G, Bonetti P, Tagger A, Casarin C, Noventa F, Ribero M, Fasola M, Ruol A, Realdi G. Relationship between serum HCV markers and response to interferon therapy in chronic hepatitis C. Evaluation of HCV genotypes during and after long-term follow-up. *Dig Dis Sci*. 1994; 39(11):2497-502.
- <sup>12</sup> Kohara M, Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka S, Mizokami M, Lau JY, Hattori N. Hepatitis C virus genotypes 1 and 2 respond to interferon-alpha with different virologic kinetics. *J Infect Dis*. 1995; 172(4):934-8.

- 
- <sup>13</sup> Alary M, Joly JR, Vincelette J, Lavoie R, Turmel B, Remis RS. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C virus in a prospective cohort study of men who have sex with men. *Am J Public Health*. 2005; 95(3):502-5.
- <sup>14</sup> World Health Organization (WHO). Fact Sheet Hepatitis C, update April 2017 Geneva 2017.
- <sup>15</sup> Poethko-Muller C, Zimmermann R, Hamouda O et al.: Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013; 56(5-6):707 – 715.
- <sup>16</sup> Biostoffverordnung. *Bundesgesetzblatt Teil I* 1999, 50; 1999, 2059; 2003, 2304; 2004, 3758; 2006, 2407 sowie TRBA 250 Neufassung von Mai 2006. In: <http://www.nadelstichverletzung.de> [Stand: 07.11.2011].
- <sup>17</sup> Robert Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin Nr. 20; 18. Mai 2009. Virushepatitis B, C und D; Situationsbericht Deutschland 2008 In: [http://edoc.rki.de/documents/rki\\_fv/reNrCsBhRlkqE/PDF/234qACVormxU.pdf](http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reNrCsBhRlkqE/PDF/234qACVormxU.pdf) [Stand: 07.11.2011].
- <sup>18</sup> Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, Han J, et al.: Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1294–8.
- <sup>19</sup> Swadling L, Capone S, Antrobus RD, Brown A, Richardson R, Newell EW, Halliday J, et al.: A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med* 2014; 6: 261ra153
- <sup>20</sup> <https://www.niaid.nih.gov/news-events/trial-evaluating-experimental-hepatitis-c-vaccine-concludes> [Stand 06.01.2021]
- <sup>21</sup> Syad Massalme: *Crashkurs Pathologie*. 1. Auflage, München: Elsevier GmbH 2004.
- <sup>22</sup> Wiese M, Grungreiff K, Guthoff W et al. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany – a 25-year multicenter study. *J Hepatol* 2005; 43: 590–598.
- <sup>23</sup> Santantonio T, Medda E, Ferrari C et al. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1154–1159.
- <sup>24</sup> Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2014;61(1, Supplement):S58-S68
- <sup>25</sup> Corrao G, Torchio P, Zambon A, Ferrari P, Aricò S, di Orio F. Exploring the combined action of lifetime alcohol intake and chronic hepatotropic virus infections on the risk of symptomatic liver cirrhosis. Collaborative Groups for the Study of Liver Diseases in Italy. *Eur J Epidemiol*. 1998; 14(5):447-56.

- 
- <sup>26</sup> Häussinger, Dieter, Niederau, Claus (Hrsg.): Hepatitis C. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage, Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag 2001.
- <sup>27</sup> Deuffic-Burban S, Deltenre P, Louvet A, Canva V, Dharancy S, Hollebecque A, Boitard J, Henrion J, Yazdanpanah Y, Mathurin P. Impact of viral eradication on mortality related to hepatitis C: a modeling approach in France. *J Hepatol.* 2008 Aug;49(2):175-83. Epub 2008 May 20.
- <sup>28</sup> Hofmann WP, Sarrazin C, Zeuzem S. Behandlung von Patienten mit chronischer Hepatitis C. *Dtsch Arztebl Int.* 2012; 109(19):352 bis 358.
- <sup>29</sup> Sarrazin C, Berg T, Buggisch P et al. Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. S3 guideline Hepatitis C addendum. *Z Gastroenterol.* 2015; 53(4):320 bis 334
- <sup>30</sup> Khakoo, S. I. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872–874 (2004).
- <sup>31</sup> Warren, H. S., Kinnear, B. F., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *The Journal of Immunology* 154, 5144–5152 (1995).
- <sup>32</sup> Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994; 76(2):287-99.
- <sup>33</sup> Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993; 177(4):1199-204.
- <sup>34</sup> Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, *Immunologie.* 5 ed. 2002: Spektrum.
- <sup>35</sup> Siegenthaler, Walter, Blum, Hubert E.(Hrsg.): *Klinische Pathophysiologie.* 9., völlig neu bearbeitete Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2006.
- <sup>36</sup> Puoti M, Zonaro A, Ravaggi A, Marin MG, Castelnuovo F, Cariani E. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 1992; 16(4):877-81.
- <sup>37</sup> Zibert A, Kraas W, Ross RS, Meisel H, Lechner S, Jung G, Roggendorf M. Immunodominant B-cell domains of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 identified during early and late time points of infection. *J Hepatol.* 1999; 30(2):177-84.
- <sup>38</sup> Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science.* 1992; 258(5079):135-40.
- <sup>39</sup> Nagayama R, Miyake K, Tsuda F, Okamoto H. IgM antibody to a hepatitis C virus core peptide (CP14) for monitoring activity of liver disease in patients with acute or chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 1994; 42(3):311-7.

- 
- <sup>40</sup> Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999 Oct;117(4):933-41.
- <sup>41</sup> Grüner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1528-36. Epub 2000 May 5.
- <sup>42</sup> Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):215-29. Review.
- <sup>43</sup> Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*. 1995 Oct 14;346(8981):1006-7.
- <sup>44</sup> Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15661-8. Epub 2002 Nov 19.
- <sup>45</sup> Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):659-62.
- <sup>46</sup> Sklan, E.H., et al., Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009. 6(4): p. 217-27.
- <sup>47</sup> Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):3447-58.
- <sup>48</sup> Rehermann, B., Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*, 2009. 119(7): p. 1745-54.
- <sup>49</sup> Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2001 Jun;75(12):5550-8.
- <sup>50</sup> Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):379-85.

- 
- <sup>51</sup> Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005 Jun;79(12):7860-7.
- <sup>52</sup> Accapezzato D, Francavilla V, Rawson P, Cerino A, Cividini A, Mondelli MU, Barnaba V. Subversion of effector CD8+ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: the role of the virus. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):438-46.
- <sup>53</sup> Manns, Michael P., Wedemeyer, Heiner: *Handbuch Hepatitis C: Diagnostik, Verlauf, Therapie*, 2. Auflage, Bremen: UNI-MED Verlag 2006.
- <sup>54</sup> RKI-Kommission-Umweltmedizin (2002) Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstestes in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 45:745-749.
- <sup>55</sup> BD Biosciences. Schematische Darstellung des optischen Systems des BD FACSCalibur™. In: [http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/facscalibur\\_features\\_opticalpath.jpg](http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/facscalibur_features_opticalpath.jpg) [Stand: 09.11.2011].
- <sup>56</sup> Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
- <sup>57</sup> Barth H, Klein K, Börtlein A, Guseo A, Berg PA, Wiethölter H, Klein R. *J Neuroimmunol*. 2002 Dec; 133(1-2):175-83. Analysis of immunoregulatory T-helper cell subsets in patients with multiple sclerosis: relapsing-progressive course correlates with enhanced T H1, relapsing-remitting course with enhanced T H0 reactivity.
- <sup>58</sup> Jeffries, DJ, De Clercq, E (Hrsg.): *Antiviral chemotherapy*, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. 1995.
- <sup>59</sup> <https://de.wikipedia.org/wiki/Ribavirin>
- <sup>60</sup> Streeter DG, Witkowski JT, Khare GP, Sidwell RW, Bauer RJ, Robins RK, Simon LN. Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(4):1174-8.
- <sup>61</sup> Reyes GR. Ribavirin: recent insights into antiviral mechanisms of action. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2001 Sep;4(5):651-6.
- <sup>62</sup> Scheidel, L.M. & Stollar, V. Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1. *Virology*. 1991; 181(2):490-9.
- <sup>63</sup> Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA

---

virus mutagen. *Nat Med.* 2000; 6(12):1375-9. Erratum in: *Nat Med* 2001; 7(2):255.

<sup>64</sup> Querenghi F, Yu Q, Billaud G, Maertens G, Trépo C, Zoulim F. Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *J Viral Hepat.* 2001; 8(2):120-31.

<sup>65</sup> Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, Norén JO, Philipson L, Stenberg K, Stening G, Stridh S, Oberg B. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 11(6):946-51.

<sup>66</sup> Fernandez-Larsson R, Patterson JL. Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Mol Pharmacol.* 1990; 38(6):766-70

<sup>67</sup> Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 2001; 276(49):46094-8. Epub 2001 Oct 15.

<sup>68</sup> Gilson RJ, Semple M, Gill SK, Loveday C, Tedder RS, Weller IV. Lack of suppression by ribavirin of HIV viraemia. *Lancet.* 1992; 339(8809):1605-6

<sup>69</sup> Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2004; 126(3):703-14.

<sup>70</sup> Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology.* 2003; 38(4):869-78.

<sup>71</sup> Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol.* 1999; 30(3):376-82.

<sup>72</sup> Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sällberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol.* 1998; 79 (Pt 10):2381-91.

<sup>73</sup> Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol.* 1999 Mar;30(3):376-82.

<sup>74</sup> Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol.* 1998; 160(7):3487-93.

<sup>75</sup> Hung et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet.* 2020 May 30;395(10238):1695-1704. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31042-4. Epub 2020 May 10.

- 
- <sup>76</sup> Togo Y, Hornick RB, Dawkins AT Jr. Studies on induced influenza in man. I. Double-blind studies designed to assess prophylactic efficacy of amantadine hydrochloride against a2/Rockville/1/65 strain. *JAMA*. 1968; 203 (13): 1089-94
- <sup>77</sup> Dolin R, Reichmann RC, Madore HP, Maynard R, Linton PN, Webber-Jones J: A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med* 1982; 307: 580.
- <sup>78</sup> Parkes D: Amantadine. *Adv Drug Res*. 1974; 8:11-81
- <sup>79</sup> Schwab RS, Poskanzer DC, England AC Jr, Young RR. Amantadine in Parkinson's disease. Review of more than two years' experience. *JAMA*. 1972; 222(7):792-5.
- <sup>80</sup> Parkes JD, Baxter RC, Curzon G, Knill-Jones RP, Knott PJ, Marsden CD, Tattersall R, Vollum D: Treatment of Parkinson's disease with amantadine and levodopa. A one-year study. *Lancet*. 1971; 1 (7709):1083-6
- <sup>81</sup> Kornhuber J, Weller M. Amantadine and the glutamate hypothesis of schizophrenia. Experiences in the treatment of neuroleptic malignant syndrome. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993; 92(1):57-65.
- <sup>82</sup> Krupp LB, Coyle PK, Doscher C, Miller A, Cross AH, Jandorf L, Halper J, Johnson B, Morgante L, Grimson R. Fatigue therapy in multiple sclerosis: results of a double-blind, randomized, parallel trial of amantadine, pemoline, and placebo. *Neurology*. 1995; 45(11):1956-61.
- <sup>83</sup> Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den Munckhof P, Fang J, Mouradian MM, Chase TN. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*. 1998; 50(5):1323-6.
- <sup>84</sup> Weller M, Kornhuber J. Amantadine withdrawal and neuroleptic malignant syndrome. *Neurology*. 1993; 43(10):2155.
- <sup>85</sup> Smith JP. Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Dig Dis Sci*. 1997; 42(8):1681-7.
- <sup>86</sup> Foster GR. Amantadine in the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1998; 30(6):614-5.
- <sup>87</sup> Hubert IF, Lunel F, Cadranel JF, Oberti F, Calès P. Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94(8):2316-7.
- <sup>88</sup> <https://de.wikipedia.org/wiki/Amantadin>
- <sup>89</sup> Parsons CG, Panchenko VA, Pinchenko VO, Tsyndrenko AY, Krishtal OA. Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine. *Eur J Neurosci*. 1996; 8(3):446-54.
- <sup>90</sup> Mizoguchi K, Yokoo H, Yoshida M, Tanaka T, Tanaka M. Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake

---

inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism. *Brain Res.* 1994; 662(1-2):255-8.

<sup>91</sup> Kornhuber J, Bormann J, Hübers M, Rusche K, Riederer P. Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study. *Eur J Pharmacol.* 1991; 206(4):297-300

<sup>92</sup> Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K, Riederer P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *J Neural Transm Suppl.* 1994; 43:91-104. Review.

<sup>93</sup> Matsubayashi H, Swanson KL, Albuquerque EX. Amantadine inhibits nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281(2):834-44.

<sup>94</sup> Feuerstein TJ. [Ketamine inhibits n-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor mediated acetylcholine release from rabbit caudate nucleus slices]. *Anaesthesist.* 1994; 43 Suppl 2:S48-51.

<sup>95</sup> Jackisch R, Link T, Neufang B, Koch R. Studies on the mechanism of action of the antiparkinsonian drugs memantine and amantadine: no evidence for direct dopaminomimetic or antimuscarinic properties. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1992; 320:21-42.

<sup>96</sup> Stoof JC, Booij J, Drukarch B, Wolters EC. The anti-parkinsonian drug amantadine inhibits the N-methyl-D-aspartic acid-evoked release of acetylcholine from rat neostriatum in a non-competitive way. *Eur J Pharmacol.* 1992; 213(3):439-43.

<sup>97</sup> Heikkila RE, Cohen G. Evaluation of amantadine as a releasing agent or uptake blocker for H<sub>3</sub> -dopamine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 1972;20(2):156-60.

<sup>98</sup> Fletcher EA, Redfern PH. The effect of amantadine on the uptake of dopamine and noradrenaline by rat brain homogenates. *J Pharm Pharmacol.* 1970;22(12):957-9.

<sup>99</sup> Mizoguchi K, Yokoo H, Yoshida M, Tanaka T, Tanaka M. Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism. *Brain Res.* 1994; 662(1-2):255-8.

<sup>100</sup> Jackisch R, Link T, Neufang B, Koch R. Studies on the mechanism of action of the antiparkinsonian drugs memantine and amantadine: no evidence for direct dopaminomimetic or antimuscarinic properties. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1992; 320:21-42.

<sup>101</sup> Heikkila RE, Cohen G. Evaluation of amantadine as a releasing agent or uptake blocker for H<sub>3</sub> -dopamine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 1972; 20(2):156-60.



- 
- <sup>102</sup> Stromberg U, Svensson TH, Waldeck B. On the mode of action of amantadine. *J Pharm Pharmacol.* 1970; 22(12):959-62.
- <sup>103</sup> Takahashi T, Yamashita H, Zhang YX, Nakamura S. Inhibitory effect of MK-801 on amantadine-induced dopamine release in the rat striatum. *Brain Res Bull.* 1996; 41(6):363-7.
- <sup>104</sup> Shannon KM, Goetz CG, Carroll VS, Tanner CM, Klawans HL. Amantadine and motor fluctuations in chronic Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 1987; 10(6):522-6.
- <sup>105</sup> Moryl E, Danysz W, Quack G. Potential antidepressive properties of amantadine, memantine and bifemelane. *Pharmacol Toxicol.* 1993;72(6):394-7.
- <sup>106</sup> Maj J. Effect of memantine on central neurotransmitter systems. *Arzneimittelforschung.* 1982; 32(10):1256-9.
- <sup>107</sup> Farnebo LO, Fuxe K, Goldstein M, Hamberger B, Ungerstedt U. Dopamine and noradrenaline releasing action of amantadine in the central and peripheral nervous system: a possible mode of action in Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 1971; 16(1):27-38.
- <sup>108</sup> Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific antiinfluenza action of amantadine. *EMBO J.* 1985; 4: 3021.
- <sup>109</sup> Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol.* 2002; 76(3):1391-9.
- <sup>110</sup> Lin YP, Wharton SA, Martín J, Skehel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. Adaptation of egg-grown and transfectant influenza viruses for growth in mammalian cells: selection of hemagglutinin mutants with elevated pH of membrane fusion. *Virology.* 1997; 233(2):402-10.
- <sup>111</sup> Clark C, Woodson MM, Nagasawa HT. Inhibition of lymphocyte proliferation by amantadine and its isomer, 2- aminoadamantane; impact on Lyt-2+ T cells while sparing L3T4+ T cells. *Immunopharmacology*, 1991, 21, 41–50.
- <sup>112</sup> Clark C, Woodson MM, Winge VB, Nagasawa HT. The antiviral drug amantadine has a direct inhibitory effect on T-lymphocytes. *Immunopharmacology*, 1989, 18, 195–204.
- <sup>113</sup> Kubera M, Maes M, Budziszewska B, Basta-Kaim A, Leśkiewicz M, Grygier B, Rogóz Z, Lasoń W. Inhibitory effects of amantadine on the production of pro-inflammatory cytokines by stimulated in vitro human blood. *Pharmacol Rep.* 2009 Nov-Dec;61(6):1105-12.
- <sup>114</sup> Carol Chang, Kameleshun Ramphul. Amantadine. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. 2020 Aug 22.
- <sup>115</sup> Martin J, Navas S, Fernández M, Rico M, Pardo M, Quiroga JA, Zahm F, Carreno V. In vitro effect of amantadine and interferon-2a on hepatitis C virus markerd in cultured peripheral blood mononuclear cells from hepatitis C virus infected patients. *Antiviral Res.* 1999; 42: 59.

- 
- <sup>116</sup> Smith JP. Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Dig Dis Sci.* 1997; 42(8):1681-7.
- <sup>117</sup> Caronia S, Crossey M, Murray-Lyon I, Lypsynyi D, Main J, Thomas HC, Foster G. A pilot study of interferon plus amantadine versus interferon alone in the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1999; 30 (Suppl. 1): 138.
- <sup>118</sup> Younossi ZM, Perrillo RP. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, and NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 1999; 19 Suppl 1:95-102.
- <sup>119</sup> Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, Berg T, Raedle J, Hartmann S, Hopf U. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alfa2a with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000; 32(4 Pt 1):835-41
- <sup>120</sup> Berg T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Pilot study of interferon-alpha high-dose induction therapy in combination with ribavirin plus amantadine for nonresponder patients with chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol.* 2001; 39(2):145-51.
- <sup>121</sup> Brillanti S, Foli M, Di Tomaso M, Gramantieri L, Masci C, Bolondi L. Pilot study of triple antiviral therapy for chronic hepatitis C in interferon alpha non-responders. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 31(2):130-4.
- <sup>122</sup> Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L. Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon nonresponsive chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000 Sep; 32(3):630-4.
- <sup>123</sup> Gonzalo Emiliano Aranda-Abreu, José D Aranda-Martínez, Ramiro Araújo, María Elena Hernández-Aguilar, Deissy Herrera-Covarrubias, Fausto Rojas-Durán. Observational study of people infected with SARS-Cov-2, treated with amantadine. *Pharmacol Rep.* 2020 Dec;72(6):1538-1541. doi: 10.1007/s43440-020-00168-1. Epub 2020 Oct 10.
- <sup>124</sup> Klaus Fink, Andreas Nitsche, Markus Neumann, Marica Grossegeesse, Karl-Heinz Eisele and Wojciech Danysz. Amantadine Inhibits SARS-CoV-2 In Vitro. *MDPI.* 24 March 2021
- <sup>125</sup> Berg PA, Becker EW. The lymphocyte transformation test - a debated method for the evaluation of drug allergic hepatic injury. *J Hepatol.* 1995 Jan;22(1):115-8.
- <sup>126</sup> <https://www.medizin.uni-tuebingen.de/de/das-klinikum/einrichtungen/kliniken/medizinische-klinik/innere-medizin-ii/laborleistungen/immunpathologisches-labor/labormethoden> [Stand 03.02.2021]
- <sup>127</sup> Rabinowitz Y. Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass column, including tissue culture observations. *Blood.* 1964 Jun;23:811-28.

- 
- <sup>128</sup> Weber-Mani U, Pichler WJ (2003) Der Lymphozytentransformationstest (LTT) in der Diagnostik von Medikamentenallergien. *Schweiz Med Forum* 15:357-361
- <sup>129</sup> Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2008. © Springer Medizin Verlag 2008: „Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest“ - Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin. In: [http://edoc.rki.de/documents/rki\\_ab/re67fIHRghoUo/PDF/26C0oxyqlxZYff.pdf](http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67fIHRghoUo/PDF/26C0oxyqlxZYff.pdf) [Stand: 07.11.2011].
- <sup>130</sup> Robert Koch Institut. „Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest“ – Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2008 · 51:1070–1076. DOI 10.1007/s00103-008-0641-3. Online publiziert: 7. September 2008
- <sup>131</sup> Zehender G, Meroni L, De Maddalena C, Varchetta S, Monti G, Galli M. Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *J Infect Dis* 1997;176:1209-1214.
- <sup>132</sup> Welker MW, Zeuzem S. Occult hepatitis C: how convincing are the current data? *Hepatology* 2009;49:665–675.
- <sup>133</sup> Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, Emerson SS, Shuhart MC, Gretch DR. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology*. 2006;43:573-80.
- <sup>134</sup> Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut*. 2008;57:1121–8
- <sup>135</sup> Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut*. 2006;55:869-77.
- <sup>136</sup> Kokordelis, P. et al. An effective IFN-mediated inhibition of HCV replication by NK cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in HIV(+) patients. *Hepatology* n/a–n/a(2013). doi:10.1002/hep.26782
- <sup>137</sup> Veronica D. Gonzalez, Karolin Falconer, Niklas K. Björkström, Kim G. Blom, Ola Weiland, Hans-Gustaf Ljunggren, Annette Alaeus and Johan K. Sandberg. Expansion of Functionally Skewed CD56-Negative NK Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Correlation with Outcome of Pegylated IFN- $\alpha$  and Ribavirin Treatment. *J Immunol* November 15, 2009, 183 (10) 6612-6618; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901437>
- <sup>138</sup> Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1002-9.

- 
- <sup>139</sup> Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 Sep;90(3 Pt 1):323-31.
- <sup>140</sup> Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277-9.
- <sup>141</sup> Mire-Sluis AR, Gaines-Das R, Thorpe R. Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? *J Immunol Methods*. 1995 Oct 26;186(2):157-60.
- <sup>142</sup> Barth H, Klein K, Börtlein A, Guseo A, Berg PA, Wiethölter H, Klein R. Analysis of immunoregulatory T-helper cell subsets in patients with multiple sclerosis: relapsing-progressive course correlates with enhanced T H1, relapsing-remitting course with enhanced T H0 reactivity. *J Neuroimmunol*. 2002 Dec;133(1-2):175-83.
- <sup>143</sup> Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. J. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *Hepatology*. 1999 Mar;30(3):376-82.
- <sup>144</sup> Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol*. 1998 Apr 1;160(7):3487-93.
- <sup>145</sup> Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeldt HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U.J. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1999 Dec;31(6):971-8.
- <sup>146</sup> Eckels DD, Tabatabail N, Bian TH, Wang H, Muheisen SS, Rice CM, Yoshizawa K, Gill J. In vitro human Th-cell responses to a recombinant hepatitis C virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation. *Hum Immunol*. 1999 Mar;60(3):187-99.
- <sup>147</sup> Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):1023-9.
- <sup>148</sup> Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. *Tuber Lung Dis*. 2000;80(4-5):197-207.
- <sup>149</sup> Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Zembala M. Modulation of monocyte-tumour cell interactions by *Mycobacterium vaccae*. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Dec;53(12):1127-34.
- <sup>150</sup> Clark C, Woodson MM, Nagasawa HT. Inhibition of lymphocyte proliferation by amantadine and its isomer, 2-aminoadamantane; impact on Lyt-

---

2+ T cells while sparing L3T4+ T cells. *Immunopharmacology*. 1991 Jan-Feb;21(1):41-50.

<sup>151</sup> Clark C, Woodson MM, Winge VB, Nagasawa HT. The antiviral drug amantadine has a direct inhibitory effect on T-lymphocytes. *Immunopharmacology*. 1989 Nov-Dec;18(3):195-204.

<sup>152</sup> Wandinger KP, Hagenah JM, Klüter H, Rothermundt M, Peters M, Vieregge P. Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 1999 Aug 3;98(2):214-20.

<sup>153</sup> Tribl GG, Wöber C, Schönborn V, Brücke T, Deecke L, Panzer S. Amantadine in Parkinson's disease: lymphocyte subsets and IL-2 secreting T cell precursor frequencies. *Exp Gerontol*. 2001 Nov;36(10):1761-71.

<sup>154</sup> Klüter H, Vieregge P, Stolze H, Kirchner H. Defective production of interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 1995 Nov;133(1-2):134-9.

<sup>155</sup> Kubera M, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Rogóz Z, Skuza G, Leskiewicz M, Tetich M, Jaworska-Feil L, Maes M, Lason W. Effect of amantadine and imipramine on immunological parameters of rats subjected to a forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006 Jun;9(3):297-305. Epub 2005 Jun 28.

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im Immunpathologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen in der Abteilung Innere Medizin II unter Betreuung von Frau Professor Doktor Reinhild Klein durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder des Immunpathologischen Labors eigenständig von mir durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Professor Doktor Reinhild Klein und mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Waiblingen, im April 2022

Susanne Maria Lohs

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Frau Professor Klein für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die Bereitstellung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit im immunpathologischen Labor der Universität Tübingen danken. Ein besonders herzlicher Dank gilt ihrer Geduld und ihren hilfreichen Anmerkungen.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team des immunpathologischen Labors für die Unterstützung während des experimentellen Anteiles der Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Sandra Plankenhorn für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die Unterstützung zu jeder Zeit bedanken.

Mein Dank geht auch an alle Probanden für die Teilnahme an dieser Studie.

Ich danke meinen Eltern für die Möglichkeit eines sorgenfreien Studiums und die immerwährende Fürsorge in allen Lebensbelangen.

Zu guter Letzt danke ich meinem Ehemann Torsten für die motivierenden Worte und die ausdauernde Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.