

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie

**Alterationen im B-Zell- und Immunglobulinkompartiment bei Patienten mit
chronischer Hepatitis C**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Leoni Emilia Wymer

aus Dortmund

2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81958

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240604-114311-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. P. E. Johansson

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. P. Hilgard

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	5
1.1	Die Hepatitis C Infektion	5
1.1.1	Epidemiologie, Übertragung und Prävention	5
1.1.2	Genotypen des Hepatitis-C-Virus.....	7
1.1.3	Klinische Symptomatik und Folgekomplikationen	8
1.1.4	Diagnose und Therapie.....	10
1.1.5	Koinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus.....	11
1.2	B-Lymphozyten und das Immunsystem	11
1.2.1	Stadien der Entwicklung.....	12
1.2.2	Immunglobuline.....	16
1.2.3	Freie Leichtketten	18
1.2.4	Lymphoproliferative Veränderungen der B-Zellen.....	19
1.3	Fragestellung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Patientenkohorte, Material und Methoden.....	25
2.2	Virusdiagnostik	27
2.2.1	Hepatitis-C-Virus.....	27
2.2.2	Humanes Immundefizienz-Virus.....	27
2.3	Messung der freien Leichtketten	28
2.4	Serumproteingelektrophorese und Immunfixation	29
2.5	Nachweis von Kryoglobulinen	32
2.6	Immunophänotypisierung.....	33
2.7	Nachweis von Immunglobulin-Genrekombinationen mittels Polymerase- Kettenreaktion	34
2.7.1	DNA-Isolierung	35
2.7.2	Konzentrationsbestimmung der DNA	35
2.7.3	Testung auf Rekombinationen in den Schwereketten- sowie Leichtkettengeneten der Immunglobuline	36
2.7.4	Auswertung der IdentiClone™-Daten.....	38
2.8	Statistische Auswertung	40

3	Ergebnisse.....	41
3.1	Immunglobulinveränderungen.....	41
	3.1.1 Messung der freien Leichtketten	42
	3.1.2 Serumgelelektrophorese und Immunfixation	45
3.2	Kryoglobulinämie	46
3.3	Immunphänotypisierung.....	47
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.5	Besonderheiten HIV-koinfizierter Patienten.....	51
3.6	Einfluss einer antiviralen Therapie auf die Serumalterationen	53
4	Diskussion	56
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang.....	75
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	75
7.2	Abkürzungsverzeichnis	76
8	Danksagung	79
9	Lebenslauf	80

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Die Hepatitis C Infektion

Die Hepatitis C ist eine beim Menschen durch das Hepatitis-C-Virus (HCV) ausgelöste Infektionskrankheit. Beim Hepatitis-C-Virus handelt es sich um ein kurzes, behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus mit einer geschätzten Länge von 96 kb, welches fast ausschließlich parenteral, meist über das Blut, seltener vertikal oder durch Geschlechtsverkehr übertragen wird. Seine genetische Sequenz wurde 1989 erstmals entschlüsselt und das Virus (damals bekannt als non-A, non-B Hepatitis Virus) der Familie der Flaviviridae zugeordnet (Choo et al., 1989).

1.1.1 Epidemiologie, Übertragung und Prävention

Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus gehören weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Die genaue Anzahl HCV-infizierter Personen ist unbekannt. Nach Angaben der WHO waren im Jahre 2019 etwa 296 Millionen Menschen chronisch mit dem Virus infiziert und etwa 1,5 Millionen Erstdiagnosen werden jährlich gestellt. Die Anzahl an Todesfällen weltweit, die durch Hepatitis C verursacht wurden, wurde im Jahre 2019 auf 820.000 geschätzt (WHO, 2021). Die Prävalenz der Erkrankung variiert global stark (siehe Abbildung 1). Die höchste Durchseuchungsrate verzeichnete Ägypten im Jahre 2015 mit einer Prävalenz von 6,3%, gefolgt von der Demokratischen Republik Kongo mit einer Prävalenz von 4,3% im Jahre 2014 (Guntipalli et al., 2021). In Deutschland lag die Anzahl an Erstdiagnosen, die im Laufe des Jahres 2021 an das Robert Koch Institut übermittelt wurden, bei 8.353. Dies entspricht einer bundesweiten Inzidenz von 0,01% (Behnke et al., 2022). Das unterschiedliche Auftreten der Erkrankung spielt nicht nur geographisch eine Rolle, sondern gilt auch innerhalb der Gesellschaft eines Landes. So haben manche Personengruppen ein höheres Risiko sich mit dem Hepatitis-C-Virus zu infizieren, als andere.

Die Übertragung des Virus erfolgt beinahe ausschließlich parenteral, sodass das derzeit höchste Infektionsrisiko bei Personen mit intravenösem (i.v.) Drogenkonsum

nachgewiesen werden kann. Global wird die Prävalenz des HCV unter intravenös Drogenkonsumierenden auf 52,3% geschätzt (Degenhardt et al., 2017).

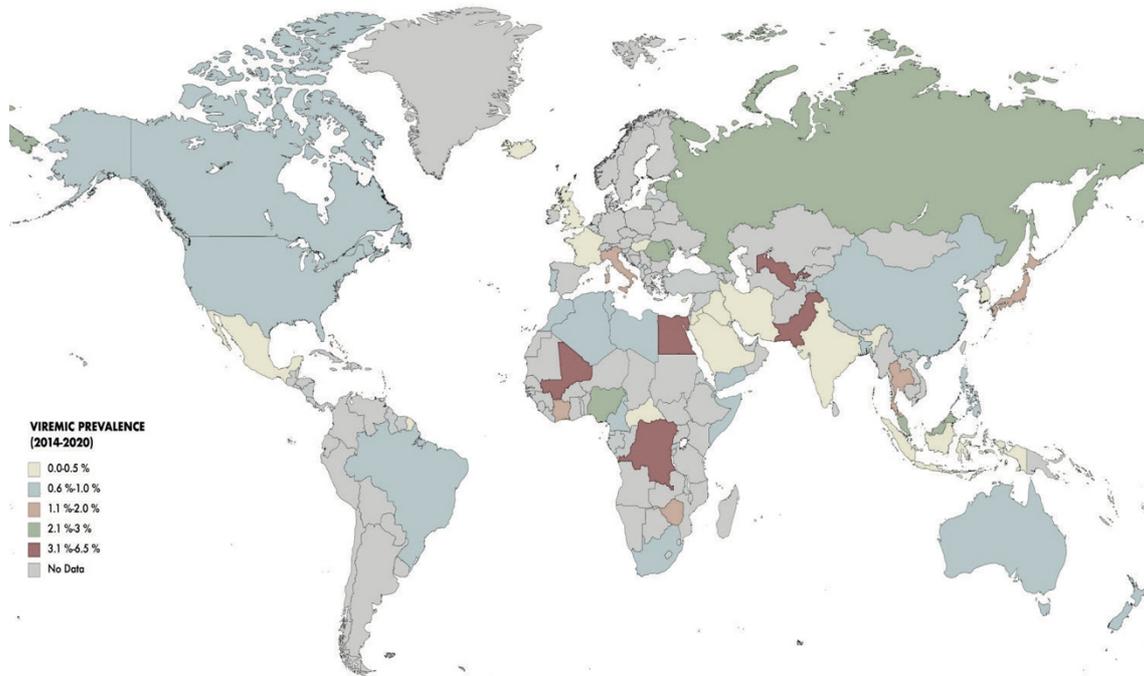


Abbildung 1: Geschätzte Prävalenzen (in Prozent) von HCV-Infektionen weltweit (Guntipalli et. al 2021)

Lange Zeit galt der Erhalt von Blut oder Blutprodukten als wahrscheinlichster Übertragungsweg. Seit Einführung der diagnostischen Tests auf Anti-HCV Antikörper 1991 und HCV-RNA 1999 ist eine transfusionsassoziierte Infektion in Deutschland extrem unwahrscheinlich. So wurden in den Jahren 1999 bis heute lediglich zwei Infektionsfälle an das Robert Koch Institut gemeldet (Himmelsbach et al., 2023). Weltweit betrachtet stellt sowohl der Erhalt von Blut oder Blutprodukten, als auch therapeutische Injektionen oder invasive Verfahren unter inadäquaten Hygienebedingungen nach wie vor ein enormes Risiko dar (Wang et al., 2022)

Vergleichsweise weniger häufig, aber dennoch erwähnenswert, sind Übertragungen auf perinatalen, sexuellen oder anderen Wegen, wie kosmetischen Prozeduren oder intranasalem Drogenkonsum. Das Risiko einer vertikalen Übertragung von einer HCV-infizierten Mutter an ihr Kind variiert je nach mütterlicher Viruslast von 3-10% (Chilaka and Konje 2021). Das sexuelle Übertragungsrisiko ist gering, es konnte jedoch ein vergleichsweise erhöhtes Risiko für Personen mit einer Koinfektion mit dem Humanen

Immundefizienz-Virus sowie homosexueller Männer nachgewiesen werden (Razavi-Amoli and Alipour, 2022).

Obwohl durch die Zulassung der direkt antiviral wirkenden Agenzien (DAA) ein grundlegender Wandel in der Therapie der HCV-Infektion stattgefunden hat und Heilungsraten von bis zu 98% erzielt werden können, gibt es nach wie vor keine Impfung oder Postexpositionsprophylaxe für das Hepatitis-C-Virus (Hayes et al., 2021). Der Fokus in der Prävention liegt darauf, die Exposition mit dem Virus zu vermindern. Aufgrund der vielzähligen Übertragungswege und unterschiedlich gefährdeten Personengruppen, stellt dies oft eine Herausforderung dar. Weltweit haben viele Organisationen, unter anderem die WHO, es sich zur Aufgabe gemacht, Leitfäden zu erarbeiten, die zu einer besseren Aufklärung der Übertragungswege, Diagnostik und Therapien beitragen und den Umgang mit der Infektion verbessern sollen (Sarrazin et al., 2018).

1.1.2 Genotypen des Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus besitzt ein sehr variables Genom mit mehreren Geno- und Subtypen, deren Verteilung geographisch variiert. Dem zugrunde liegt eine relative Ungenauigkeit der für die Replikation notwendigen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Lohmann et al., 2000). So kann es bei der Replikation durch ein mangelhaftes Korrekturlesen (englisch: *proofreading*) zu einer Entwicklung unterschiedlicher, aber verwandter Quasispezies kommen, was eine große Herausforderung für das Immunsystem darstellt (Lauer and Walker, 2001). Es werden sieben Genotypen (1-7) des HCV unterschieden, die sich wiederum in circa 60 Subtypen untergliedern lassen (Smith et al., 2014).

Weltweit hat der Genotyp 1 die höchste Prävalenz und macht etwa 46,2 % aller HCV-Fälle aus. Die zweithöchste Prävalenz weltweit hat Genotyp 3 (30%). Betrachtet man Genotyp 2, 4 und 6 machen diese zusammen etwa 22,8% der HCV-Fälle aus (Messina et al, 2015).

In Europa ist vorwiegend Genotyp 1 (61,0 %) vertreten, gefolgt von Genotyp 3 mit einer Prävalenz von (20,0 %) (Petruziello et al., 2019). Auch in Deutschland ist der Genotyp 1 am häufigsten vertreten (78%). Im Zeitraum zwischen den Jahren 2017 und 2018 lag das Verhältnis von Genotyp 1a zu 1b bei 59%/41% (Simon et al.,2021).

Die Dauer und Wahl der Therapie, als auch das Ansprechen ist vom Genotyp abhängig, weshalb die Bestimmung klinisch von hoher Relevanz ist. Studien zeigten, dass beispielsweise für Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 sechs erfolgreiche Therapieregimes der DAA in Frage kommen, wohingegen die Therapieoptionen bei Patienten mit dem Genotyp 3 limitiert sind (zwei Regimes) (Falade-Nwulia et al., 2017).

1.1.3 Klinische Symptomatik und Folgekomplikationen

Das Hepatitis-C-Virus kann sowohl eine akute als auch eine chronische Infektion verursachen. Wie der Name bereits andeutet, zeichnet sich die Hepatitis-C-Infektion durch eine Entzündung der Leber aus. Die Inkubationszeit liegt bei etwa sieben bis acht Wochen nach Exposition (Lauer and Walker, 2001). HCV zeigt eine starke Affinität zu Hepatozyten, aber auch zirkulierende Lymphozyten und andere Zelltypen können betroffen sein (Vallat et al., 2004, Lauer and Walker, 2001). Als akute Infektion wird eine Infektion bezeichnet, die innerhalb von sechs Monaten ausheilt und bei der im Anschluss keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden kann. Die akute Infektion verläuft nicht selten asymptomatisch, kann aber auch mit grippeähnlichen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit oder subfebrilen Temperaturen einhergehen. In seltenen Fällen kommt es durch die Leberentzündung zu einem ikterischen Verlauf, bei der es zu Gelbfärbung der Haut und Skleren, sowie Juckreiz und Entfärbung des Stuhls kommt.

Durch die oft milde und unspezifische Symptomatik sind sich viele Infizierte ihrer Infektion nicht bewusst. Bleibt eine akute Infektion unbehandelt, kommt es bei 10-15% der Fälle innerhalb von sechs Monaten zu einer spontanen Ausheilung. Persistiert das Virus länger als sechs Monate im Körper kommt es zu einer chronischen Infektion (Sarrazin et al., 2018).

Patienten, bei denen es zu einer chronischen Infektion kommt und die keine antivirale Therapie erhalten, haben ein hohes Risiko im Laufe der Erkrankung eine Leberfunktionsstörung, Leberzirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln. Das Risiko für chronisch Infizierte, innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose zu entwickeln, liegt bei 15-20% und wird von Faktoren wie Alter, Genotyp und Geschlecht beeinflusst (Erman et al., 2019, Thein et al., 2008). Patienten mit einer

Leberzirrhose wiederum entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von 2-4% im Laufe eines Jahres ein hepatozelluläres Karzinom (Westbrook and Dusheiko, 2014).

Ob es zu einer Leberzirrhose oder gar zu einem HCC kommt, kann vom Verhalten des Patienten oder anderen Kofaktoren beeinflusst sein. So tragen beispielsweise übermäßiger Alkohol-Konsum oder eine Infektion mit Hepatitis B oder HIV zu einem höheren Entstehungsrisiko der oben genannten Erkrankungen bei (Freeman et al., 2003). HCV-Infektionen können nicht nur Lebererkrankungen verursachen, sondern sind ebenso mit einer Vielzahl an extrahepatischen Komplikationen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass es unter HCV-Infizierten häufig zur Entwicklung von monoklonalen B-Zell-Populationen in der Leber und im Blut kommt, welche trotz Ausheilung der HCV-Infektion im Körper persistieren können (Vallat et al., 2004, Visentini et al., 2019, Terrier et al., 2011). Als monoklonal werden Zellen bezeichnet, die von einer Ursprungszelle abstammen. Im Gegensatz dazu sind Zellen polyklonaler Zellpopulationen von vielen verschiedenen Ursprungszellen abstammend. Oligoklonale Populationen wiederum stellen eine Mischung von Zellen dar, die von wenigen verschiedenen Zellen abstammen. Eine monoklonale Zell-Population lymphatischer Zellen kann beispielsweise im Rahmen einer Infektion oder Impfung eine physiologische Reaktion des Körpers darstellen. Sollte diese jedoch über einen gewissen Zeitraum hinaus persistieren oder eine definierte Zellzahl im Blut überschreiten, ist dies ein Hinweis auf ein neoplastisches Geschehen.

Auch die Entwicklung von lymphoproliferativen Veränderungen wie gemischte Kryoglobulinämie (englisch: *mixed cryoglobulinemia* (MC)), monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (englisch: *monoclonal gammopathy of undetermined significance* (MGUS)) und das B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) scheinen im engen Zusammenhang mit einer chronischen HCV-Infektion zu stehen.

Der molekulare Mechanismus, welcher diesem Zusammenhang zugrunde liegt, ist nach wie vor unzureichend geklärt. Es existieren verschiedene Theorien, welche die HCV-induzierte Lymphoproliferation zu erklären versuchen (Peverling-Oberhag et al., 2013), welche im Abschnitt 1.2.4 näher beschrieben werden.

Darüber hinaus zählen Glomerulonephritiden, Thyreoiditis, das Sjögren Syndrom, Insulinresistenzen und weitere Hauterkrankungen zu den extrahepatischen Manifestationen, wobei einige dieser auch in Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer MC gebracht werden können (Sarrazin et al., 2018, Visentini et al., 2019).

1.1.4 Diagnose und Therapie

Während der akuten Immunreaktion auf das Hepatitis-C-Virus kommt es zur Bildung von Anti-HCV-Antikörpern, die ein Leben lang im Körper nachweisbar sind. Bei der Basisdiagnostik werden diese Antikörper mithilfe eines Immunoassays bestimmt. Bei Personen mit einem positiven Anti-HCV-Antikörper Status muss im nächsten Schritt ein Nukleinsäure-Nachweis (englisch: *Nucleic acid test* (NAT)) mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt werden, um Virus-RNA zu detektieren und zwischen einer abgelaufenen und chronischen Infektion unterscheiden zu können (Thomson et al., 2011). Der Nachweis der HCV-Antikörper ist in der Regel erst nach sieben bis acht Wochen möglich. Bei Verdacht auf eine akute HCV-Infektion ist aufgrund dieses serodiagnostischen Fensters die sofortige Bestimmung der HCV-RNA indiziert, die bereits nach ein bis zwei Wochen detektierbar ist. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 IU HCV RNA/ml. Ebenso wird bei Immunkompromittierten die gleichzeitige Bestimmung der RNA empfohlen, da die Bildung der anti-HCV-Antikörper gänzlich ausbleiben kann (Sarrazin et al., 2018).

Bei Erstdiagnose einer HCV-Infektion sind weitere virologisch-serologische Tests wie HAV-, HBV- und HIV-Diagnostiken, Bestimmung von Basislaborparametern, eine Sonographie des Oberbauchs, sowie gegebenenfalls eine Leberbiopsie anzuschließen.

Des Weiteren wird der HCV-Genotyp und die HCV-Viruslast bestimmt, um eine in Frage kommende Therapie planen und überwachen zu können.

Lange Zeit galt die Kombinationstherapie aus dem Nukleosid-Analogen Ribavirin und pegyliertem Interferon α als Standardtherapie der Hepatitis C. Seit Zulassung direkt antiviral wirkender Agenzien (DAA) gegen Proteine des HCV hat sich das Spektrum enorm erweitert. Höhere Heilungsraten können erzielt werden und Therapiemöglichkeiten für beinahe alle Patienten mit einer chronischen Hepatitis C sind erreichbar. Interferonfreie Therapiekombinationen (DAA), die nicht nur nebenwirkungsärmer und hocheffektiv sind, aber auch kürzere Therapiezeiten aufweisen, stehen zur Verfügung. So konnte beispielsweise das Risiko zur Entwicklung eines HCC in allen Stadien einer Leberfibrose gesenkt werden (Roche et al., 2018, Parikh et al., 2022). Gegenwärtig sind die konventionellen Substanzen Ribavirin und PEG-Interferon- α , Proteaseinhibitoren (wie Glezaprevir, Grazoprevir etc.), NS5A-Inhibitoren (wie

Daclatasvir, Elbasvir und Ledipasvir etc.), und nukleosidische und nicht-nukleosidische NS5B-Inhibitoren zur Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassen (Sarrazin et al 2018). Je nach Genotyp, Komorbiditäten und Risikofaktoren werden unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten empfohlen.

1.1.5 Koinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus

Schätzungsweise 6,2 % der Menschen, welche an HIV infiziert sind, sind zusätzlich an HCV infiziert. Die Wahrscheinlichkeit, sich mit HCV zu infizieren ist sechsmal höher bei Menschen mit einer HIV-Infektion, als bei Personen, welche nicht mit HIV infiziert sind. Die höchste Prävalenz konnte bei Menschen mit intravenösem Drogenkonsum und homosexuellen Männern festgestellt werden (Gobran et al., 2021)

Menschen mit einer Koinfektion beider Viren weisen eine erhöhte HCV-Viruslast auf und lange Zeit ging man davon aus, dass sie ein erhöhtes Risiko einer fortschreitenden Lebererkrankung mit erhöhtem Risiko einer Leberzirrhose sowie Entwicklung eines HCC haben (Thein et al., 2008). Aktuelle Studien, welche HCV-positive Patienten mit einer Leberzirrhose untersuchten, zeigen jedoch, dass eine Koinfektion mit HIV nicht mit einer erhöhten Inzidenz eines HCC einherzugehen scheint (Salmon et al., 2019). Zusätzlich stellte man fest, dass HIV-positive Patienten, welche ebenso an HCV infiziert sind, ein verändertes Ansprechen auf eine antiretrovirale Therapie (ART) mit erhöhtem Risiko einer ART-bedingten Lebertoxizität aufweisen (Matthews und Dore, 2008). Andersherum betrachtet konnten jüngste Studien zeigen, dass sich die Erfolgsraten bezüglich einer HCV-Therapie mit DAA nicht unterscheiden hinsichtlich einer Koinfektion mit HIV (Mishra et al., 2023).

1.2 B-Lymphozyten und das Immunsystem

B-Lymphozyten, auch B-Zellen genannt, gehören zur Gruppe der Leukozyten. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem des menschlichen Körpers. Es setzt sich aus der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr zusammen, die je eine zelluläre und eine humorale Komponente aufweisen. Während die unspezifische Immunabwehr angeboren und eher erregerunspezifisch ist, unterliegt die spezifische Immunität einer

lebenslangen, erregerbedingten Adaption. Hauptaufgaben der angeborenen Komponente bestehen in der mechanischen Barriere vor körperfremden Antigenen, deren Phagozytose und der Kommunikation mit dem spezifischen System.

Die spezifische, auch adaptive Immunität, ist abhängig von der Konfrontation des Organismus mit verschiedenen Antigenen und passt sich ein Leben lang an. T-Zellen stellen hierbei eine zelluläre Komponente dar; Antikörper, die von differenzierten B-Lymphozyten produziert werden, die humorale Komponente.

Nur durch ein enges Zusammenspiel beider Komponenten kann die komplexe Immunreaktion des Körpers bewerkstelligt werden (Janeway's Immunobiology, 10th edition, 2022).

1.2.1 Stadien der Entwicklung

Die Entwicklung der B-Lymphozyten geht von den hämatopoetischen Stammzellen aus und findet präpartal zunächst im Dottersack, der Leber, der Milz, dem Thymus und ab dem 6. Fetalmonat auch im Knochenmark statt. Nach der Geburt erfolgt sie dann im Knochenmark sowie dem lymphatischen System.

Die Reifung von der pro-B-Zelle zur Antikörper sezernierenden Plasmazelle unterliegt dem Einfluss extrazellulärer Signale und Transkriptionsfaktoren (Cobaleda et al., 2007). Jede reife, aktivierte B-Zelle hat die Fähigkeit genetisch determinierte, identische und individuelle Antikörper zu produzieren, die sich von denen anderer B-Lymphozyten unterscheiden (Burnet, 1959; Talmage 1959). Die *klonale Selektionstheorie von Burnet* besagt, dass jede B-Zelle diesen individuellen Antikörper als Rezeptor auf der Zelloberfläche trägt und anhand diesem durch den komplementären Antigenkontakt selektiert werden kann. Kommt es in frühen Phasen der Entwicklung zum Kontakt mit körpereigenen Antigenen, wird der Zelltod eingeleitet, um eine Selbsttoleranz zu entwickeln. Kommt es nach der Reifung zu Kontakt mit externen Antigenen, wird eine klonale Expansion und Weiterentwicklung zum Antigen produzierenden B-Lymphozyten initiiert (Rajewsky, 1996).

Bei der B-Zell-Entwicklung ist demnach die Synthese dieses funktionsfähigen B-Zell-Rezeptors (BCR) von entscheidender Rolle (siehe Abbildung 2). Dieser ist ein

membranständiger Immunglobulin (Ig)-Antikörper, der als Rezeptor fungiert und der Antigenerkennung dient (Rajewsky, 1996, Melchers et al., 2000). Antikörper bestehen aus zwei identischen Schwereketten (H) und zwei identischen Leichtketten (L) (siehe Abbildung 3). Während Schwereketten von den Genen V_H (*variable*), D_H (*diversity*) und J_H (*joining*) codiert werden, werden Leichtketten von den Genen V_L und J_L codiert. Einzelheiten zum Aufbau und Funktion von Antikörpern ist dem Abschnitt 1.2.2 zu entnehmen.

Um einen individuellen und spezifischen Antikörper synthetisieren zu können, finden innerhalb dieser Genabschnitte eine Reihe von gezielten Rekombinationen statt. Aufgrund der Vielzahl von möglichen Antigenen, müssen zahlreiche Antikörper bereitgestellt werden (Rajewsky, 1996).

Die Entwicklung der B-Lymphozyten beginnt mit der Pro-B-Zelle, die sich im ersten Schritt aus der hämatopoetischen Stammzelle entwickelt hat (siehe Abb. 2).

In diesem Stadium findet zunächst die Genumlagerung in den für Schwereketten kodierenden Genabschnitten $V_H D_H J_H$ statt (Burnet, 1959). Pro-B-Zellen, die eine erfolgreiche $V_H D_H J_H$ -Rekombination durchlaufen haben, exprimieren eine Schwerekette vom Typ μ und gehen in den nächsten Differenzierungsschritt über (Rajewsky, 1996).

Der nächste Differenzierungsschritt stellt die Prä-B-Zelle da, die auf ihrer Oberfläche bereits einen Prä-B-Zell-Rezeptor (pBCR) trägt. Dieser Prä-B-Zell-Rezeptor wird zum einen von der oben genannten Schwerekette vom Typ μ , zum anderen von Ersatzleichtketten gebildet (Melchers, 2005). Wird ein intakter pBCR auf der Zelloberfläche exprimiert, werden weitere Differenzierungsschritte eingeleitet und die Genumlagerung in den Leichtketten codierenden Genen V_L und J_L beginnt (Rolink et al., 1993).

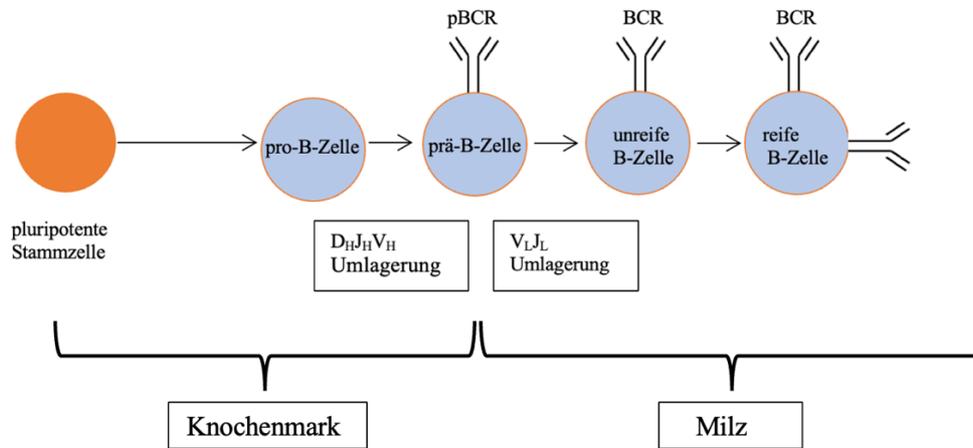


Abbildung 2: Entwicklung der B-Lymphozyten: durch Umlagerungen in den Schwerketten-kodierenden Genen ($D_H J_H V_H$) wird zunächst mithilfe von Ersatzleichtketten (V_{preB} und 5λ) ein präBCR (pBCR) gebildet. Nach Umlagerung der Leichtketten-kodierenden Genen ($V_\kappa J_\kappa$ und $V_\lambda J_\lambda$) werden die Ersatzleichtketten durch κ oder λ ausgetauscht und es wird schließlich ein funktionaler BCR auf der Zelloberfläche präsentiert (in Anlehnung an Rajewsky (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 381: 751-758)

Man unterscheidet zwei Isotypen von Leichtketten, κ -Leichtketten und λ -Leichtketten. Kommt es zur Expression dieser Leichtketten, werden diese zusammen mit den bereits vorhandenen Schwerketten anstatt der Ersatzleichtketten in den Oberflächenrezeptor eingebaut und es besteht ein funktionaler B-Zell-Rezeptor (BCR). Die B-Zelle wird nun als unreife B-Zelle bezeichnet. Unreife B-Zellen werden nun einem Selektionsverfahren unterzogen, bei dem es zur Bindung zwischen dem BCR und Autoantigenen kommt. Durch diesen Prozess soll die Spezifität des BCR sichergestellt werden, mit dem Ziel eine Reaktion gegen körpereigene Proteine im Sinne einer autoimmunen Reaktion zu verhindern. Kommt es bei Antigenkontakt zu einer ausgeprägten autoimmunen Reaktion, wird der Zelltod (Apoptose) eingeleitet oder es finden Modifikationsmechanismen statt und der Selektionsprozess beginnt erneut. Positiv selektierte B-Zellen werden zur reifen B-Zelle (auch naive B-Zelle) und gelangen ins periphere Blut (Rajewsky, 1996). Charakteristisch für reife B-Zellen ist, dass sie neben dem Immunglobulin IgM (repräsentiert durch den BCR) auch das Immunglobulin IgD auf der Zelloberfläche tragen. Zudem exprimieren etwa 60% der naiven B-Zellen κ -Leichtketten, 40% Zellen λ -

Leichtketten. Mit etwa 45% stellen naive B-Zellen den größten Teil der B-Zellpopulation im peripheren Blut dar.

Im Blutkreislauf angekommen, haben sie die Möglichkeit sekundäre Lymphorgane wie beispielsweise Lymphknoten zu erreichen, in denen weitere Reifungsprozesse stattfinden. Trifft ein reifer B-Lymphozyt auf ein komplementäres Antigen, wird dieses in die Zelle aufgenommen und mit Hilfe eines MHC-II-Moleküls (engl.: *major histocompatibility complex class II*) auf der Zelloberfläche präsentiert. In der T-Zell-Zone der Lymphknoten werden diese antigenbeladenen B-Lymphozyten durch T-Helferzellen festgehalten. Eine aktivierte T-Helferzelle, die durch ihren T-Zell-Rezeptor fähig ist, den entsprechenden MHC-II-Antigen-Komplex auf der B-Zelle zu erkennen und zu binden, führt zu einer Aktivierung des B-Lymphozyten. Eine Aktivierung führt zu einer raschen klonalen Proliferation dieses B-Lymphozyten, welches den Primärfokus darstellt. Ein Teil dieser neu entstandenen B-Lymphozyten differenziert sich im Anschluss zu kurzlebigen Plasmazellen, welche im Sinne der primären Immunantwort zahlreiche Antikörper niedriger Affinität produzieren. Ein anderer Teil entwickelt sich im Knochenmark während sogenannter Keimzentrumsreaktionen zu langlebigen Plasmazellen (Bortnick and Allmann, 2013, Nutt et al., 2015). In diesem Abschnitt der Reifung kommt es zur erneuten massiven Expansion dieser aktivierten B-Zellen, währenddessen gezielte Affinitätsreifungen durch somatische Hypermutationen im IgV-Gen stattfinden können. Ziel dieser Reaktionen ist es, eine höhere Affinität des zu exprimierenden Antikörpers gegenüber dem Antigen zu schaffen. Nur Zellen mit einer verbesserten Affinität überleben, wohingegen bei negativ selektierten B-Zellen die Apoptose eingeleitet wird.

Ein weiterer Prozess, den B-Lymphozyten im Keimzentrum durchlaufen können, ist der Antikörper-Klassenwechsel (engl.: *class switch*), bei der es durch gezielte Rekombinationen im Schwereketten Gen zur Expression von Antikörpern der Klasse IgG, IgA und/oder IgE anstatt der ursprünglichen IgM und IgD kommt.

B-Zellen, die letztlich das Keimzentrum verlassen, können sich im Sinne einer erworbenen Immunantwort zu B- Gedächtniszellen differenzieren (Khodadadi et al., 2019, Rajewsky, 1996).

Neben dieser konventionellen B-Zell-Population (auch B2-Zellen) existiert eine Subpopulation an B-Lymphozyten, die als B1-Zellen bezeichnet werden. Sie sind durch

die Expression eines Oberflächenmarkers CD 5 charakterisiert, der für gewöhnlich eher auf T-Lymphozyten zu finden ist. Beim Neugeborenen machen sie etwa 50% der vorhandenen B-Lymphozyten aus, während dieser Anteil im Laufe des Lebens auf circa 5% absinkt. Sie synthetisieren vorwiegend Immunglobuline vom Typ IgM und sind im Gegensatz zu B2-Zellen durch eine geringere Affinität und geringere Spezifität gegenüber ihrem Liganden geprägt (Tsuji et al., 1997). Sie sind selbsterneuernd und sezernieren spontan Immunglobuline. Sowohl bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis als auch bei Patienten mit einem Sjögren-Syndrom konnten erhöhte Anteile dieser CD5⁺-B-Lymphozyten nachgewiesen werden, wodurch ein Zusammenhang zur Pathogenese autoantigener Erkrankungen zu vermuten ist (Dauphinée et al., 1988).

CD5⁺-B-Lymphozyten, auch CD5⁺-Zellen unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften von CD5⁻-Zellen (Mageed et al., 2012). Studien der letzten Jahrzehnte zeigten, dass die Funktion des Oberflächenmarkers CD5 in der Modulation von B- und T-Zell-Signalen liegt. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass CD5 neben seiner Signalmodulation auch als ein Funktionsrezeptor in anderen Teilen des Immunsystems zu agieren scheint (Burgueño-Bucio et al., 2019).

Aber auch bei Erkrankungen wie der essentiellen Kryoglobulinämie oder Infektionen mit HIV oder dem Epstein-Barr-Virus konnte eine Koinzidenz abnorm erhöhter Serumwerte der B1-Zellen aufgezeigt werden (Sampalo et al., 1993, Pietrogrande et al., 1995). Bei Patienten mit einer Hepatitis C gelang es mittels immunhistochemischer Verfahren das Vorkommen dieser CD15⁺-Zellen in lymphoiden Follikeln in der Leber zu detektieren, wo sie Antikörper vom Typ IgM produzieren, die sowohl als monoklonale als auch als polyklonale Antikörper bestimmt werden konnten (Monteverde et al., 1997).

1.2.2 Immunglobuline

Immunglobuline (Ig), ein Synonym für Antikörper, sind globuläre Proteine. Sie werden von Plasmazellen produziert und sezerniert und sind so als freie Moleküle aufzufinden oder befinden sich als membranständiger Rezeptor auf der Oberfläche von B-Zellen (BCR).

Ihre Funktion kann in zwei Hauptfunktionen unterteilt werden. Zum einen dienen sie der Erkennung und Bindung von Antigenen und zum anderen der Interaktion mit weiteren Zellen und Effektormolekülen des Immunsystems.

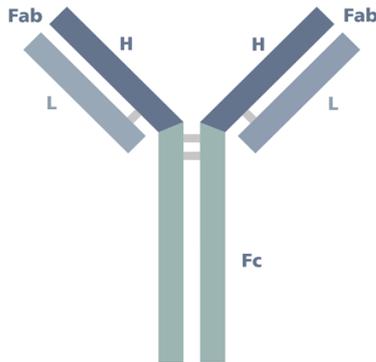


Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers mit zwei identischen Schwereketten H (engl. heavy chains) und zwei identischen Leichtketten L (engl. light chain), Fab-Fragment = Antigen bindendes Fragment (engl.: *antigen-binding fragment*), Fc-Fragment = kristallisierbares Fragment (engl.: *crystallisable fragment*)

Die Grundstruktur entspricht einem Tetramer aus jeweils zwei identischen Schwereketten und zwei identischen Leichtketten (siehe Abbildung 2), wobei die Namensgebung sich hierbei auf das Molekulargewicht bezieht. Man unterscheidet zwischen fünf Isotypen von Schwereketten, anhand dieser die Antikörper in Klassen unterteilt werden. Dementsprechend ermöglichen die Isotypen μ , δ , γ , α , ϵ die Ausbildung der Immunglobuline (Ig) IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Leichtketten hingegen werden in die Subtypen κ und λ aufgliedert und können mit allen Isotypen der Schwereketten kombiniert werden. In frühen Phasen einer Immunantwort werden vorwiegend Antikörper der Klasse IgM und IgD synthetisiert. Kommt in späteren Phasen zum oben beschriebenen Klassenwechsel, sind vermehrt Immunglobuline der Klassen IgA, IgE und IgG zu finden (Janeway et al., 2002). Die Ketten sind durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen miteinander verbunden und bilden folglich am Beispiel von IgG makromolekular eine Y-förmige Struktur aus. Jede Kette besteht aus einem variablen und einem konstanten Abschnitt, die von sogenannten Domänen ausgebildet werden. Während sich Leichtketten aus einer variablen Domäne VL und einer konstanten Domäne

CL zusammensetzen, kommt es bei Schwerketten zu einem Zusammenschluss von einer variablen Domäne VH und in Abhängigkeit vom Isotyp drei (IgA, IgD und IgG) oder vier (IgM und IgE) konstanten Domänen CH1-H4. Zwischen den Domänen CH1 und CH2 befindet sich eine Scharnierregion, die der Beweglichkeit des Antikörpers dient. Der Anteil oberhalb dieser Scharnierregion, also VH und CH1 der Schwerkette und die gesamte Leichtkette bilden gemeinsam das Fab-Fragment (Antigen-bindendes Fragment), wohingegen der Anteil unterhalb der Scharnierregion als Fc-Fragment (engl.: *crystallizable*) bezeichnet wird und die Effektorfunktion übernimmt (Padlan, 1994).

1.2.3 Freie Leichtketten

Sind Leichtketten nicht an Schwerketten gebunden und demnach nicht Teil eines kompletten Antikörpers, werden diese als freie Leichtketten (FLC) bezeichnet. Sie liegen in freier Form im Serum vor und werden ausgeschieden im Urin als Bence-Jones Proteine bezeichnet. Man unterscheidet zwischen zwei Typen von freien Leichtketten κ und λ , die jeweils aus einem variablen und einem konstanten Abschnitt zusammengesetzt sind. Während FLC κ als Monomer vorliegt, sind FLC λ in der Regel in dimerisierter Form aufzufinden. Sie werden erstmalig während der Entwicklung der B-Zellen synthetisiert und dort zusammen mit den produzierten Schwerketten auf der B-Zell-Oberfläche in Form des BCR exprimiert. Ihr Produktionsmaximum wird schließlich im Stadium der Antikörper produzierenden Plasmazelle erreicht. Um zu gewährleisten, dass stets genügend Leichtketten zur Antikörper-Produktion zur Verfügung stehen, werden sie mit einem Überschuss von 40% synthetisiert. Nicht eingebaute Leichtketten werden gemeinsam mit den fertigen Immunglobulinen sezerniert und gelangen so in den Blutkreislauf. Eine Produktion von 500 mg/Tag wird als normal angesehen. Angekommen in der Niere werden sie glomerulär filtriert, metabolisiert und im proximalen Tubulus rückresorbiert (Sinclair et al., 1986). Beim gesunden Menschen sollten folglich nur geringe Mengen an FLC im Urin nachweisbar sein. Aufgrund unterschiedlicher Produktions- und Filtrationsraten resultiert im Serum im Normalfall ein stabiles Verhältnis von κ/λ : 0,26-1,65. Kommt es zur monoklonalen Expansion einer Plasmazelle kann es durch vermehrte FLC-Produktion eines Subtyps zur Verschiebung dieses Verhältnisses kommen. Bei einer polyklonalen B-Zell-Expansion hingegen kommt

es zum Anstieg beider FLC-Subtypen, was nicht in einer Verschiebung des Verhältnisses resultieren sollte (Jenner, 2014).

1.2.4 Lymphoproliferative Veränderungen der B-Zellen

Das klinische Spektrum von B-lymphoproliferativen Veränderungen ist weit und reicht von einer asymptomatischen Expansion einer monoklonalen B-Zell-Population bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie dem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL), Multiplen Myelom (MM), der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) oder einem Mantelzelllymphom. B-lymphoproliferative Veränderungen spiegeln sich in der monoklonalen Expansion einer gut differenzierten B-Zelle wider und gehen oft mit einer Dysregulation der humoralen und zellulären Immunität einher. Frühe Stadien lymphoproliferativer Erkrankungen sind oft durch das Auftreten einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) oder dem Nachweis monoklonaler Antikörper im peripheren Blut detektierbar, wie es bei der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) der Fall ist (Shim et al., 2007). Sowohl MBL als auch MGUS sind mit einem höheren Lebensalter assoziiert. Obwohl die meisten Fälle von lymphoproliferativen Veränderungen benigne verlaufen, können MBL und MGUS nachweislich Vorläufer eines malignen Geschehens darstellen (Goldin et al., 2013).

Die häufigste maligne Folgeerscheinung einer MBL ist dabei die CLL, die die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt darstellt (Siegel et al., 2013). Aufgrund der unterschiedlichen immunophänotypischen Erscheinungsformen kann die monoklonale B-Lymphozytose anhand Fluoreszenz-markierter Durchflusszytometrie (FACS) identifiziert und klassifiziert werden. Dabei spielt das Vorhandensein des Oberflächenmarkers CD5⁺ auf der B-Zelle eine entscheidende Rolle. Tragen die B-Lymphozyten auf der Oberfläche keinen CD5⁺-Marker, so werden sie der Gruppe der *Non-CLL-MBL* zugeordnet. Wird der Oberflächenmarker CD5⁺ exprimiert, so wird weiter zwischen *CLL-like-MBL* und *Atypical-CLL-MBL* unterschieden (siehe Tabelle 1) (Shanafelt et al., 2010).

Tabelle 1: Definitionen der Subtypen von MBL anhand ihrer Immunphänotypen (dim=reduziert, bright=ausgeprägt) (in Anlehnung an Shanafelt et al., 2010)

MBL-Subtyp	Immunphänotyp
CLL-like MBL	CD19 ⁺ , CD5 ⁺ , CD20 ^{dim}
Atypical-CLL-MBL	CD19 ⁺ , CD5 ⁺ , CD20 ^{bright}
Non-CLL-MBL	CD19 ⁺ , CD5 ⁻ , CD20 ^{bright}

So besitzen Patienten mit einer CLL-like-MBL eine monoklonale B-Zell-Population mit den gleichen Oberflächenmarkern wie Patienten mit einer CLL, erfüllen jedoch nicht vollständig die Kriterien einer CLL (Goldin et al., 2013). Im Jahre 2005 wurde MBL schließlich definiert als das Vorhandensein einer monoklonalen B-Zell-Population über mindestens drei Monate mit einer Gesamtanzahl an B-Lymphozyten von unter $5 \times 10^9/l$ und einer negativen Patientenhistorie für B-lymphoproliferative Erkrankungen (Rawstron, 2013).

Die Prävalenz einer MBL hängt vom Alter und der Detektionsmethode ab und variiert zwischen 5-12% bei Menschen über 40 Jahren und zwischen 5-20% ab einem Alter von 60 Jahren (Dagklis et al., 2009, Shim et al., 2010). Des Weiteren wird die MBL anhand ihrer absoluten Anzahl an B-Lymphozyten in „*low count*“ und „*clinical*“ unterteilt, wobei die Mehrzahl aller MBL der Gruppe der „*low-count*“ zugeordnet werden kann. Patienten, die aufgrund ihrer B-Lymphozyten-Zahl „*clinical*“ entsprechen, haben im Vergleich mit 1-2% ein höheres Risiko eine CLL zu entwickeln (Goldin et al., 2013).

Obwohl alle Fälle von CLL eine MBL als Vorläufer zu haben scheinen und der Gedanke naheliegt, MBL als Marker für frühe Erkrankungsstadien einzusetzen, ist zu betonen, dass die Mehrzahl von MBL nicht in ein malignes Geschehen übergehen (Shanafelt et al., 2010, Marti et al., 2007). Eine weitere Methode, eine monoklonale B-Zell-Population im peripheren Blut zu erfassen, ist der Nachweis identischer Genumlagerungen im Genabschnitt für Immunglobulin-Schwerketten und κ -Leichtketten. Diese rekombinanten Immunglobulin-Gene können hierbei PCR-basiert vervielfältigt und erfasst werden.

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) ist das humorale Gegenstück zur monoklonalen B-Lymphozytose. Sie stellt einen prämaligen Zustand

für lymphoproliferative Erkrankungen dar, wobei sie als Vorläufer von Plasmazellveränderungen wie dem Multiplen Myelom und der Waldenström Makroglobulinämie anzusehen ist. In seltenen Fällen konnte auch eine Progression zum B-NHL oder der CLL aufgezeigt werden (Shim et al., 2007). MGUS wird definiert durch das Vorhandensein eines monoklonalen Proteins (M-Protein) im Serum mit einer Konzentration vom maximal 3g/dl, einem maximalen Anteil monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark von 10% und dem Fehlen eines assoziierten Endorganschadens (Goldin et al., 2013). Sie kann untergliedert werden in IgM-MGUS und non-IgM-MGUS, wobei gezeigt werden konnte, dass IgM-MGUS eher die Vorstufe der Waldenström Makroglobulinämie darstellt, während die non-IgM-MGUS eher das Multiple Myelom zur Folge haben kann (Kyle et al., 2011). Der Nachweis einer MGUS findet durch eine Immunfixation statt. Obwohl MGUS in 80% der Fälle durch die Expression von dem Schwerekettenimmunglobulin IgH definiert ist, gibt es 20%, in denen das Schwerekettenimmunglobulin fehlt und welche als Leichtketten-MGUS bezeichnet werden (Dispensieri et al., 2010). Die Prävalenz von MGUS unter Erwachsenen ist alters- sowie geschlechtsabhängig und variiert von 0,05 bis 6.1% (Goldin et al., 2013). Studien zeigten, dass der Entwicklung eines Multiplen Myeloms regelmäßig die monoklonale Gammopathie vorausgeht (Greenberg et al., 2013, Landgren et al., 2009). Das durchschnittliche Risiko eine maligne Erkrankung zu entwickeln liegt bei etwa 1,5% jährlich (Kyle et al., 2011). Um die maligne, monoklonale Expansion abzuschätzen, wird die Messung der freien Leichtketten (FLC) im Serum empfohlen. Ferner scheint ein Abweichen des Verhältnisses der beiden Leichtketten zueinander ein Risikofaktor für die Progression von MGUS darzustellen (Rajkumar et al., 2005).

Sowohl MBL als auch MGUS bieten die Möglichkeit den Einfluss von umgebenden und genetischen Faktoren in Hinsicht auf die Entwicklung und Progression lymphoproliferativer Erkrankungen in der Bevölkerung weiter in Augenschein zu nehmen.

Bei den Risikofaktoren lymphoproliferativer Veränderungen scheint HCV eine wichtige Rolle zu spielen. Es existieren mehrere Theorien, die den molekularen Mechanismus dieses Zusammenhanges zu erklären versuchen.

Ein Konzept beschreibt, dass die chronische Antigenstimulation durch das Virus zu einer malignen monoklonalen Proliferation der B-Lymphozyten führt, wobei das virale

Hüllprotein E2 als wichtigstes Antigen in diesem Prozess beschrieben wird (Marcucci and Mele, 2011, Hartridge-Lambert et al., 2012). Ein zweiter Mechanismus besteht darin, dass dieses Hüllprotein E2 eine hohe Bindungsaffinität zu einem Oberflächenrezeptor CD 81 hat, der auf B- und T-Lymphozyten exprimiert wird. Es wird angenommen, dass diese Interaktion zwischen E2 und CD81 eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen, dem Schutz vor aktivierungsinduzierter Apoptose und der Regulierung immunologischer Funktionen spielt und dadurch zur Pathogenese beiträgt (Marcucci and Mele, 2011). Ein weiterer Ansatz, der den Zusammenhang zwischen dem Hepatitis-C-Virus und der Lymphoproliferation zu erklären versucht, geht von einer direkten Infektion der B-Zelle mit dem Virus aus. Obwohl ein Eindringen und eine Vermehrung des Virus in seltenen Untergruppen, wie den CD5⁺-B-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Curry et al., 2003), ist nach wie vor umstritten, ob sich das Virus auch in anderen B-Zellpopulationen replizieren kann und ob es einen direkten Einfluss auf die Lymphoproliferation nimmt (Marcucci and Mele, 2011, Hartridge-Lambert et al., 2012). Die als „hit and run“-Mechanismus beschriebene Theorie wiederum erwägt, dass HCV Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen verursachen kann und diese schließlich zu einer malignen Transformation der B-Zelle führen (Machida et al., 2004).

Auch für die Kryoglobulinämie stellt die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus einen Risikofaktor dar, in diesem Fall den Größten (Brouet et al., 1974, Terrier and Cacoub, 2013). Kryoglobuline sind Immunkomplexe, die eine systemische Vaskulitis der kleinen Gefäße hervorrufen können. Betroffen sind vor allem die Haut, Gelenke, das periphere Nervensystem und die Niere. Per definitionem handelt es sich um zirkulierende Immunglobuline, die bei Absinken der Serumtemperatur unter Körperkerntemperatur ausfallen und bei Wiedererwärmen wieder in Lösung gehen. Kryoglobuline können immunochemisch in drei Unterformen eingeteilt werden. Typ-I-Kryoglobuline sind einzelne, monoklonale Immunglobuline, die im Rahmen einer lymphoproliferativen Erkrankung auftreten. Typ-II-Kryoglobuline sind Komplexe bestehend aus polyklonalen IgG und monoklonalen IgM, während Typ-III-Kryoglobuline Komplexe aus polyklonalen IgG und polyklonalen IgM darstellen. Typ-II- und Typ-III-Kryoglobulinämien gehen mit einem aktiven Rheumafaktor einher und werden aufgrund ihrer Komplexbildungen oft als gemischte Kryoglobulinämie (engl.: *mixed*

cryoglobulinemia) zusammengefasst (Brouet et al., 1974). In Zusammenhang mit einer Hepatitis C Infektion stehen vor allem die Kryoglobulinämien vom Typ II und III (Antonelli et al., 2008). Die Symptome einer Kryoglobulinämie sind sehr variabel und reichen von milden Symptomen wie Müdigkeit und Gelenkschmerzen bis hin zu fulminanten, lebensbedrohlichen Komplikationen wie einer Glomerulonephritis (Cacoub et al., 1999, Trejo et al., 2001).

Eine Erhöhung der κ -FLC sowie ein Abweichen des κ/λ -Verhältnisses steht in enger Korrelation mit der Progression lymphoproliferativer Veränderung und der Entwicklung einer Kryoglobulinämie oder eines B-NHL. Interessanterweise kann eine erfolgreiche antivirale Therapie der HCV-Infektion zur Normalisierung der freien Leichtkettenveränderungen führen und könnte somit ein Ersatzmarker zur Kontrolle der HCV-assoziierten Lymphoproliferation darstellen (Terrier et al., 2009).

Man geht davon aus, dass jedoch die monoklonalen B-Zell-Populationen, zu denen es bei HCV-Patienten häufig kommt, trotz Ausheilung der HCV-Infektion zu persistieren scheinen. Es besteht die Theorie eines „schlafenden“ Stadiums, indem die Produktion von pathologischen Antikörpern unterdrückt ist (Visentini et al., 2019).

1.3 Fragestellung

Lymphoproliferative Veränderungen der B-Zellen können wie oben beschrieben in lebensbedrohlichen Erkrankungen wie dem B-NHL, dem Multiplen Myelom oder der B-CLL enden. Obwohl das Lebenszeitrisiko an einer malignen lymphoproliferativen Erkrankung der B-Zellen zu versterben auf etwa 1,5% geschätzt wird, diskutiert man nach wie vor über den genauen Krankheitsverlauf, die Ätiologie und Prognose der Erkrankungen (Shim et al., 2007). Infektionen, im Besonderen die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus, scheinen bei der Pathogenese eine Rolle zu spielen (Vallat et al., 2004, Hamazaki et al., 2003). So haben einige Studienberichte einen signifikanten epidemiologischen Zusammenhang zwischen der HCV-Infektion und der Entwicklung von B-NHL zeigen können (Mele et al., 2003). Da die antivirale Therapie der HCV-Infektion, sowohl Interferon-basiert als auch mithilfe der DAA einen positiven therapeutischen Effekt auf das HCV-assoziierte B-NHL erkennen lässt, geht man davon aus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Virus und der B-Zellproliferation

besteht (Vallisa et al., 2005, Giannelli et al., 2003). Der genaue Mechanismus wird trotz intensiver Forschungsbemühungen stark diskutiert. Ergebnisse experimenteller Studien lassen auf ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen vermuten, die in einer HCV-vermittelten B-Zelltransformation resultieren (Forghieri et al., 2012). Die verschiedenen Theorien, welche die HCV-induzierte Lymphoproliferation zu erklären versuchen, sind in Abschnitt 1.1.4 näher beschrieben.

Vor diesem Hintergrund geht die hier dargestellte Arbeit dem Ziel nach, Veränderungen im B-Zell-Kompartiment HCV-infizierter Patienten zu ermitteln, die auf die Entstehung eines B-NHL hinweisen. Darüber hinaus war das Ziel, den Einfluss einer antiviralen Therapie auf diese Veränderungen im B-Zell-Kompartiment zu beobachten. Dazu wurden Blutproben eines monozentrischen HCV-Patientenkollektivs des Uniklinikums Essen mehreren Untersuchungen unterzogen.

2 Material und Methoden

Um monoklonale oder polyklonale Immunglobulinexpansionen zu detektieren und zu definieren wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Immunofixation sowie die Messung der freien Leichtketten durchgeführt. Zur Charakterisierung der B-Zellpopulationen mit möglich vorhandener MBL sind Daten einer fluoreszenz-gestützten Durchflusszytometrie des hämatologischen Instituts in die Analyse und Interpretation eingegangen. Klonale Rekombinationsmuster in den Genabschnitten für die Immunglobulinketten IgH und Igk wurden mittels PCR-basierten *clonality assays* (IdentiCloneTM, *InVivoScribe Technologies*) identifiziert und gaben ebenso Hinweis auf das Vorhandensein monoklonaler B-Zellpopulationen.

Des Weiteren wurde ein Teil der Kohorte auf das Vorhandensein kälteagglutinierender Antikörper mit dem Hinweis auf eine Kryoglobulinämie hin untersucht.

Da ein Teil der untersuchten Kohorte neben der Infektion an HCV auch an HIV infiziert war, wurden Auffälligkeiten derer Immunglobulinveränderungen nochmals gesondert betrachtet. Um einen möglichen Einfluss einer antiviralen Therapie der Hepatitis C auf die Serumalterationen der Immunglobuline zu ermitteln, wurden Serumproben auf das Vorhandensein von freien Leichtketten zu zwei Zeitpunkten gemessen, vor Therapieeinleitung und 24 Wochen nach Beenden der Therapie. Anhand der gemessenen

HCV-Viruslast konnte eine Gegenüberstellung des Therapieergebnisses mit den FLC-Veränderungen nachvollzogen werden.

2.1 Patientenkohorte, Material und Methoden

Das Patientenkollektiv besteht aus 328 Patienten mit der gesicherten Diagnose einer chronischen Hepatitis C (CHC) Infektion, die sich im Zeitraum von 2008 bis 2011 in der Poliklinik der Gastroenterologie des Universitätsklinikums Essen vorstellten (siehe Tabelle 2). Klinische Daten sowie Behandlungshistorien wurden prospektiv erhoben. Detaillierte Follow-Up-Daten nach Beendigung der Therapie konnten für 33 Patienten gesammelt werden. Für die Analysen standen uns EDTA-antikoaguliertes peripheres Blut und/oder Serum aus verbliebenem Material zu diagnostischen Zwecken (left-overs) zur Verfügung. Analysen dieser Proben fanden nach ausführlicher Information und Einverständniserklärung des Patienten statt. Ein positives Ethikvotum lag vor (Nummer: 09-4029, Datum: 03.05.2017). Die Probenentnahme erfolgte bei Erstdiagnose an therapie-naiven Patienten. Die Diagnose einer CHC erfolgte gemäß der S3 Leitlinie der DGVS (Sarrazin et al., 2018) und bestand bei positivem Nachweis von anti-HCV Antikörpern und HCV-RNA im Blut für mindestens sechs Monate. Die Viruslast wurde in EDTA-antikoaguliertem Blut bestimmt und konnte mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert werden. Lag eine Koinfektion mit HIV vor, wurden diese Patienten separat betrachtet. Eine HIV-Infektion bestand bei positivem Antikörpersuchtest mittels Immunassay (ELISA) und positivem Bestätigungstest mittels Western-Blot (indirekte Nachweismethode) und dem Nachweis der HIV-RNA (direkte Nachweismethode) (Hammer et al, 2008).

Die Kontrollgruppe bestand aus 53 alters- und geschlechtsangepassten gesunden Personen, welche nachweislich nicht an einer CHC und/oder HIV-Infektion erkrankt waren.

Für den Beginn einer antiviralen Therapie wurden die Standardkriterien gemäß S3-Leitlinie der DGVS herangezogen (Sarrazin et al., 2018).

Tabelle 2: Patientencharakteristika

	Patienten (n=328)	%
PCR monoklonal ¹	11/104	10,6
PCR suspekt ¹	8/104	7,7
HIV koinfiziert	33/328	10,1
FLC > ULN (45,7)	149/325	45,9
FLC Ratio erhöht ²	5/325	1,5
FLC Ratio erniedrigt ²	4/325	1,2
FLC Ratio monoklonal (gesamt) ²	9/325	2,8
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal) ²	143/325	44,0
MGUS ³	10/325	3,1
CD19/ μ l verändert ⁴	27/66	40,9
CD19 absolut erhöht	12/66	18
CD19 absolut erniedrigt	15/66	22
CD3 gesamt verändert ⁵	40/67	59,7
CD3 absolut erhöht	18/67	29,9
CD3 absolut erniedrigt	22/67	32,8
HCV Genotyp 1 ⁶	198	72,5
Genotyp 1a	89	32,6
Genotyp 1b	107	39,1
HCV Genotyp 2 ⁶	5	1,8
Genotyp 2a	2	0,7
Genotyp 2b	1	0,4
Genotyp 2c	1	0,4
HCV Genotyp 3 ⁶	63	23,1
Genotyp 3a	61	22,3
HCV Genotyp 4 ⁶	7	2,6
Genotyp 4d	3	1,1
Männlich	197	60,1
Weiblich	131	39,9
Alter (Jahre)	18-90	
Durchschnittsalter Männer (Jahre)	47,9	
Durchschnittsalter Frauen (Jahre)	53,8	
Vortherapie	97/220	44,1
Anzahl HCV Vortherapien	1 - 6	
1 Therapie	60	27,3
2 Therapien	21	9,5
3 Therapien	11	5
4 Therapien	1	0,5
5 Therapien	1	0,5
6 Therapien	1	0,5
Therapiedauer (Monate)	1 – 92 (Durschnitt: 13,9 Monate)	

Abstand zum Therapieende (Monate)	0 – 192	
Therapieversager	17	17,9

1 PCR von 104 Patienten vorhanden

2 FLC von 325 Patienten bekannt

3 MGUS von 325 Patienten bekannt, 1 Fall unter FUP nach erfolgreicher Therapie

4 CD19 (Zelluläres Immunogramm) von 66 Patienten bekannt

5 CD3 (Zelluläres Immunogramm) von 67 Patienten bekannt

6 Genotyp von 273 Patienten bekannt

2.2 Virusdiagnostik

2.2.1 Hepatitis-C-Virus

Zur virologischen Diagnostik einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus wurde der Anti-HCV Assay der Firma ARCHITECT als Suchtest verwendet. Dieser ist ein chemiluminisierendes Mikropartikel-Immunoassay (CMIA), welcher einen qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis-C-Virus im menschlichen Serum und Plasma erlaubt. Bei positiven (reaktiven) Befunden fand zur Bestätigung und zur Bestimmung der Viruslast eine quantitative HCV-RNA-Bestimmung mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (PCR) statt. Eine Detektion ist auch im niedrigen Bereich von 1 – 42 IU/ml gegeben. Für die Untersuchung wird EDTA-Blut oder Vollblut benötigt.

2.2.2 Humanes Immundefizienz-Virus

Zur Virusdiagnostik einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) wurde zum qualitativen Nachweis der HIV Ag/Ab Combo Assay angewandt. Dies ist ein chemilumineszierender Mikropartikel-Immunoassay für die simultane Detektion des HIV p24 Antigens sowie der anti-HIV-1 und anti-HIV-2 Antigene in humanem Serum oder Plasma.

2.3 Messung der freien Leichtketten

Die Messung der freien Leichtketten erfolgte mithilfe des FREELITE™ Human Kappa und FREELITE™ Human Lambda Kits der Firma „The Binding Site“ (Birmingham, UK) auf dem Nephelometer BN II (Siemens Dade Behring, Marburg).

Diese Kits enthalten polyklonale, monospezifische Schafantikörper, die an Polystyrenlatexpartikel gebunden sind, um eine Agglutination zu erleichtern. Die enthaltenen Antikörper besitzen eine Antigenbindungsstelle, mit der sie an ein Epitop der freien Leichtketten binden können. Die Epitope sind nur dann für den Antikörper zugänglich, wenn die Leichtkette nicht an eine Schwereketten gebunden und demnach kein Teil eines kompletten Immunglobulins ist (siehe Abbildung 4).

Da Antikörper (anti- κ oder anti- λ -FLC) durch das Kit in Überzahl angeboten werden, ist die Anzahl der gebildeten Immunkomplexe proportional zur Anzahl der im Reagenz enthaltenen Antigene, in diesem Fall der getesteten freien Leichtketten.

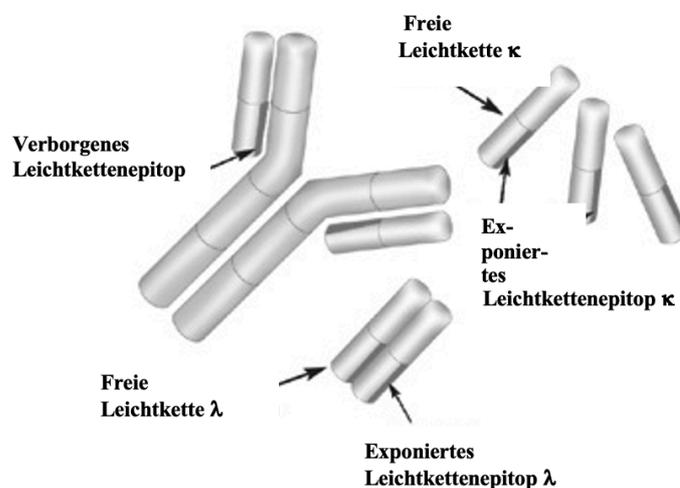


Abbildung 4: Darstellung der FLC und deren Antikörper-Epitope (aus „The binding site- Freelite® & Hevylite®“ assay manual, 2015, mit freundlicher Genehmigung von Elizabeth Rice)

Das Messprinzip besteht darin, dass ein eingelenkter Lichtstrahl durch diese unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplexe gelenkt wird. Die entstehende Streuung wird durch einen Sensor gemessen und ist je ausgeprägter, desto mehr Immunkomplexe gebildet wurden.

Die Kalibrierung vor der Messung erfolgte gemäß Anleitung des Geräteherstellers. Für die Messung wurden 300µl jeder Probe unverdünnt dem Nephelometer zugefügt und dort automatisch auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt. Die Konzentrationen der κ-FLC und λ-FLC wurden anschließend automatisiert gemessen und im Anschluss die κ/λ-Ratio gebildet. Eine Ratio außerhalb des Normbereichs ist dabei ein höchst sensitiver Indikator für eine monoklonale Erhöhung von κ-FLC oder λ-FLC im Serum, während Abweichungen von Normwerten für κ-FLC und λ-FLC bei normwertiger κ/λ-Ratio eher für eine polyklonale Veränderung beider Leichtketten sprechen.

Bei Werten außerhalb des Messbereichs wurde die Messung in angepasster Verdünnung wiederholt. Normwerte und Messbereiche sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Messbereiche und Normwerte FLC im Serum

	Messbereich (mg/l)	Normwerte (mg/l) (Katzmann et al., 2002)	
		Median	95% Referenzintervall
κ	5,9- 190	7,3	3,3- 19,4
λ	5- 160	12,7	5,7- 26,3
κ/λ		0,6	0,26- 1,65 (100% RI)

Die Messung der freien Leichtketten im Serum konnte in oben beschriebener Methodik bei 325 mit einer chronischen Hepatitis-C erkrankten Patienten durchgeführt werden.

2.4 Serumproteingelelektrophorese und Immunfixation

Ergänzend zum Nachweis monoklonaler FLCs mittels nephelometrischer Messung erfolgte eine Serumproteingelelektrophorese, die das Vorhandensein monoklonaler Antikörper (IgG, IgA, IgM) sowie monoklonaler Leichtketten (κ,λ) anzeigte (siehe Abbildung 5).

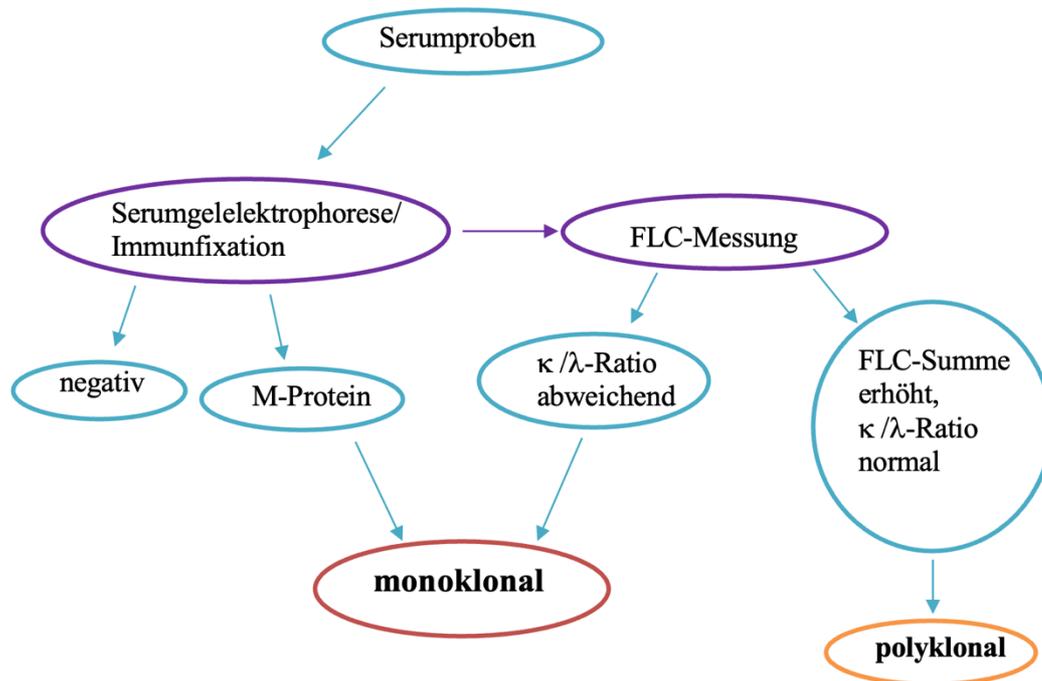


Abbildung 5: Graphische Darstellung der FLC (freie Leichtketten)-Messung und Serumgelelektrophorese/Immunfixation und ihre ergänzende Eigenschaft in der Detektion monoklonaler und polyklonaler Immunglobulinveränderung

Konnte eine monoklonale Fraktion mittels sichtbarer Bande festgestellt werden, erfolgte im nächsten Schritt eine Immunfixation, welche dann Aufschluss darüber gab, um welches der Proteine es sich handelte. Die Serumgelelektrophorese und die Immunfixation konnten ebenso wie die FLC-Messung an 325 Serumproben unserer HCV-positiven Patientenkohorte durchgeführt werden.

Um einen möglichen Einfluss einer antiviralen Therapie gegen die chronische Hepatitis C auf die Serumalterationen der Immunglobuline zu ermitteln, wurden bei 33 Patienten der HCV-positiven Kohorte die freie Leichtkettenmessung und die Serumproteingelelektrophorese bzw. Immunfixation an zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Zum einen fand eine Untersuchung vor Einleitung der antiviralen Therapie statt (T1), zum anderen 24 Wochen nach Beendigung der Therapie (FUP 24) (T2). Anhand der regelmäßig gemessenen Viruslasten konnten die Ergebnisse entsprechend der damals gültigen Ansprechkriterien mit dem Erfolg oder Misserfolg der antiviralen Therapie gegenübergestellt werden. Eine Einteilung der Patienten erfolgte je nach Therapieausgang in „Responder“, „Non-Responder“ und „Relapse“.

Sowohl die Serumproteingelelektrophorese, als auch die Immunfixation wurden auf dem halbautomatisierten Elektrophoresegerät Hydrasys der Firma Sebia (Fulda, Deutschland) durchgeführt.

Während der Serumproteingelelektrophorese (SPE) werden die Serumproteine entsprechend ihrer Größe auf einem Gel mit alkalischer Pufferlösung ($\text{pH } 9,1 \pm 0,1$) aufgetrennt. Als Pufferreservoir dienen streifenförmige Pufferschwämme ($\text{pH-Wert : } 9,1 \pm 0,3$). Pro Patient wurden zwei Ansätze mit je $10 \mu\text{l}$ unverdünntem Serum auf einem Agarosegel (HYDRAGEL 6/12 IF Penta Kit, Sebia, Fulda) aufgetragen. Eine Positivkontrolle erfolgte für jedes Gel.

Nach der Proteinauftrennung wurde der erste Ansatz mit einer Fixierlösung versehen, der Zweite mit einem pentavalenten Antiserum (bestehend aus Säugetier-Anti-Human-Gesamtimmungglobulin gegen Gamma- (IgG), Alpha- (IgA), Mu- (IgM) Schwerketten, κ - und λ - Leichtketten). Die Lösung und das Antiserum diffundieren in das Gel, was ein Ausfallen der entsprechenden Proteine zur Folge hat. Nach Inkubation, Blotting zur Entfernung löslicher Proteine und Trocknung wurde dem Gel eine Amidoschwarzlösung zugefügt, um die im Gel verbliebenen Immunkomplexe bzw. vorhandene Banden anzufärben. Bei einer unauffälligen Serumprobe ist eine nur leicht sichtbare, verwaschene Zone zu sehen, die das Vorhandensein polyklonaler Immunglobulin-Ketten (IgG, IgA, IgM, κ, λ) widerspiegelt. Handelt es sich um eine polyklonale Hypergammaglobulinämie ist diese Zone stärker sichtbar, ohne jedoch klare Banden abzugrenzen. Bei Proben mit einer monoklonalen Gammopathie sind eine oder mehrere klar abgrenzbare Banden auffällig. Die Auswertung der Gele erfolgte densitometrisch auf dem Hyrys-Densitometer (Sebia, Fulda). Eine Gammafraktion größer als 15,8% wurde als Hypergammaglobulinämie angesehen.

Ist auf dem Gel mit dem pentavalenten Serum eine suspekte Bande aufgetreten, wurde mit dem entsprechenden Serum eine Immunfixation mittels HYDRAGEL 9 IF Kit (Sebia, Fulda) angeschlossen, um genauer differenzieren zu können, um welche Komponente es sich handelte. Dazu wurden pro Patient zwei Serumverdünnungen hergestellt ($4 \mu\text{l}$ Serum mit $20 \mu\text{l}$ Diluent für die Spur mit anti-IgG und $20 \mu\text{l}$ Serum mit $40 \mu\text{l}$ Diluent für die Spuren mit anti-IgM, -IgA, - κ , - λ) und insgesamt fünf Ansätze pro Patient elektrophoretisch aufgetrennt. Zu jeder Spur wurde im Anschluss eines der jeweiligen Antiseren Anti-IgG, -IgM, -IgA, - κ , - λ hinzugefügt. Zur Sichtbarmachung der Banden

und somit der Immunkomplexe erfolgte eine Färbung mit Säureviolett. Bei Auftreten einer Bande konnte in diesem Falle genau benannt werden, um welche monoklonale Fraktion es sich handelt und die vorliegende monoklonale Gammopathie näher charakterisiert werden.

2.5 Nachweis von Kryoglobulinen

Bei Kryoglobulinen handelt es sich um zirkulierende Immunglobuline (Ig), die Präzipitate bilden, wenn das Serum sich unter Körperkerntemperatur abkühlt und bei Erwärmung wieder in Lösung gehen.

Für den Nachweis dieser Kryoglobuline wurde pro Patient 30 ml peripheres Blut benötigt. Das Blut wurde in vorgewärmte Serumröhrchen je 10 ml abgenommen und anschließend für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Um Serum zu erhalten, wurde das Blut von den zellulären Bestandteilen getrennt. Hierzu fand eine Zentrifugation mit 3500 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 37°C und 2200 x g für 10 Minuten statt. Das Serum wurde in neue Röhrchen überführt und der Prozess unter den oben genannten Bedingungen wiederholt. Unmittelbar danach folgte ein erneuter Transfer des Serums in skalierte Glasröhrchen (Wintrobe tubes, 10ml), welche dann auf 4°C runtergekühlt wurden. Nach 48 Stunden wurde das Glasröhrchen in eine *swing-bucket-rotor*-Zentrifuge überführt und dort bei 4°C mit 1800 UpM für 20 Minuten bei 2200 x g zentrifugiert.

Waren Kryoglobuline vorhanden, sind diese ausgefallen und waren als weißlicher Niederschlag am Boden des *Wintrobe*-Röhrchens sichtbar (siehe Abbildung 6).

Die Menge der Kryoglobuline wurde in Prozent zur Gesamtmasse des sich im *Wintrobe*-Röhrchen befindlichen Serums angegeben. Bereits der Nachweis von Präzipitaten unter 1% wurde dabei als Kryoglobulinämie angesehen.

Die Testung auf Kryoglobuline konnte bei 24 Patienten unserer HCV-positiven Kohorte durchgeführt werden.

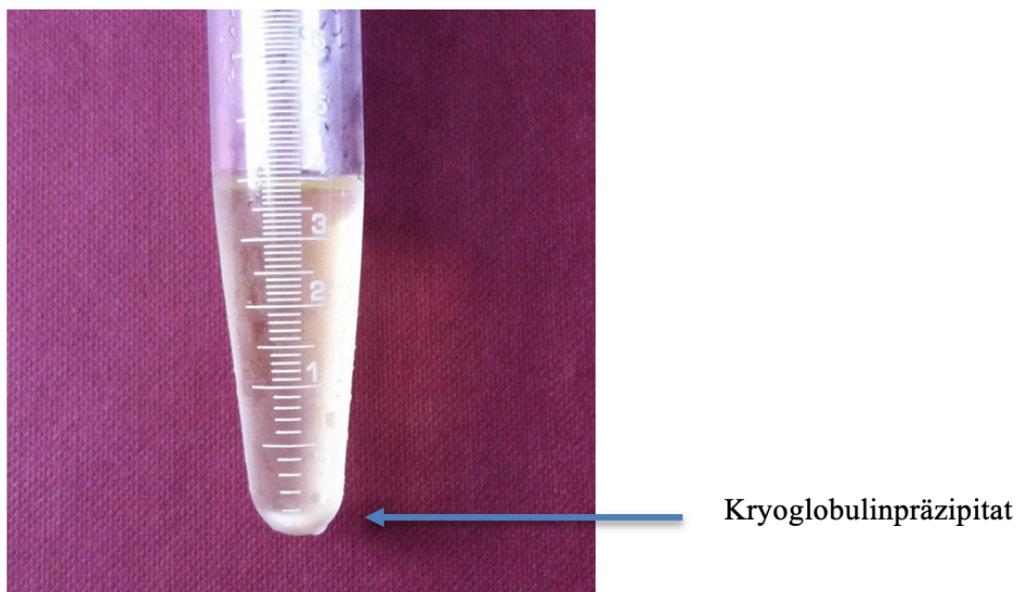


Abbildung 6: Darstellung von Kryoglobulinpräzipitaten in einem Wintrobe-Röhrchen

2.6 Immunophänotypisierung

Um eine eventuell vorliegende monoklonale B-Lymphozytose (MBL) festzustellen, wurde eine 5-Farben-Durchflusszytometrie auf dem Gerät Cytomic FC 500 der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten gemäß den klinischen Standardbedingungen. Grundlage der Durchflusszytometrie ist, dass ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelter Antikörper gegen ein spezifisches auf Lymphozyten befindliches Antigen mit einer Patientenprobe inkubiert wird. Nach Auswaschen überschüssiger Antikörper wird die Probe derart durch eine Messkammer geleitet, dass die Zellen einzeln nacheinander durchlaufen können. Während dieses Vorganges werden die antikörperbeladenen Zellen mit einem Laser angeregt, welches eine Fluoreszenz erzeugt, die detektiert wird. Dieses Vorgehen ermöglicht die Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine.

Pro Patient wurden 300 µl peripheres EDTA-Blut benötigt. Zu Beginn wurde das Blut zweimalig mit einem FACS-Puffer gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (4 min, 500 x g) verworfen. Durch Hinzufügen von 150 µl Pufferlösung entstand eine Suspension, die im nächsten Schritt für zwei Ansätze und eine Isotypenkontrolle

aufgeteilt wurde. Die Isotypenkontrolle ermöglicht die Bestimmung des Hintergrundsignals des Antikörpers.

Eine angesetzte Lösung mit monoklonalen Antikörpern bestehend aus 10 µl CD19-ECD, 10 µl CD5-PE Cy5 (Firma Beckman Coulter), 10 µl kappa-FITC, 10 µl lambda-PE und 5 µl CD20-PE Cy7 (Firma DakoCytomation) wurde beiden Ansätzen zugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Proben in einem lichtgeschützten Ort bei Raumtemperatur (18- 20° C) für 15-20 Minuten inkubiert. Um Erythrozyten aus der Probe zu eliminieren wurde nach der Inkubation 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer beigemischt und unter denselben Bedingungen inkubiert.

Nach Zentrifugation mit 150 x g für 5 Minuten unter Raumtemperatur konnte der Überstand abpipettiert werden. Beide Ansätze wurden anschließend zusammen mit 500 µl Zellwasch-Lösung (CellWash) in das Durchflusszytometer gegeben und dort nach oben beschriebenem Prinzip analysiert.

Die Durchführung der 5-Farben-Durchflusszytometrie erfolgte an insgesamt 119 Proben, von denen 66 Proben unserer HCV-positiven Kohorte entstammten und 53 Proben einer dem Geschlecht und Alter vergleichbaren HCV-negativen Kohorte.

2.7 Nachweis von Immunglobulin-Genrekombinationen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Umlagerung und Rekombination der Immunglobulingene findet während der Reifung der B-Lymphozyten statt. Es entstehen Produkte, die in ihrer Länge und Sequenz spezifisch für bestimmte Zellen eines B-Zell-Klons sind. Möchte man nun feststellen, ob eine monoklonale B-Zell-Population vorliegt, macht man sich diese Kenntnis zunutze und ermittelt diese spezifische Genkombination.

Zur Ermittlung der Gensequenzen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mithilfe des IdentiClone™ IGH und IdentiClone™ IGK Gene Clonality Assays der Firma InVivoScribe Technologies durchgeführt. Dabei kommt es zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten zwischen zwei Primern, die je auf eine gewisse Region des Immunglobulin-Gens abzielen. Die IdentiClone™ PCR Assays stellen je nach Master-

Mix unterschiedliche Primer zur Verfügung, die auf verschiedene Genabschnitte gerichtet sind und somit eine Erfassung zahlreicher Rekombinationen möglich machen. Die Primer sind an fluoreszierenden Farbstoff gebunden (6FAM, NED oder HEX). Bei der Analyse der fertigen PCR-Produkte im Kapillarelektrophoresegerät ABI 3130 (Firma Applied Biosystem) wird bei Laseranregung je nach Farbstoff ein anderes Emissionsspektrum erzeugt, welches wiederum durch einen Sensor detektiert werden kann.

2.7.1 DNA-Isolierung

Im ersten Schritt dieser Methode musste genomische DNA aus den zur Verfügung stehenden Proben (peripheres EDTA-Blut) isoliert werden. Mittels EZ1® und dem EZ1 DNA Blood 350 µl Kit der Firma Qiagen konnte die DNA automatisiert in einem Schritt gewonnen werden. Das Prinzip des EZ1® basiert darauf, dass die DNA an magnetische Partikel (Siliziumdioxid beschichtet) bindet, die von einem von außen wirkenden Magneten angezogen werden und im Gefäß zurückgehalten werden. Die Lysate wiederum werden durch einen Waschvorgang (1,8 ml 80% Ethanol Waschlösung) aus dem Gefäß gespült und die zurückbleibende DNA kann in ihrer reinen Form in Puffer eluiert werden. Pro Probe wurde 350 µl peripheres EDTA-Blut verwendet und die DNA in 50 µl Elutionspuffer gelöst.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Um sicherzustellen, dass die Konzentration der DNA in den isolierten Proben ausreichend vorhanden war, wurde eine Messung (260/280 nm) auf dem NanoDrop 2000 C®-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) angeschlossen. Für die Messung benötigt man 1 µl der Probe. Die Konzentration wird dabei durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt und sollte bevorzugt im Bereich zwischen 100 µl/ml und 400 µl/ml liegen.

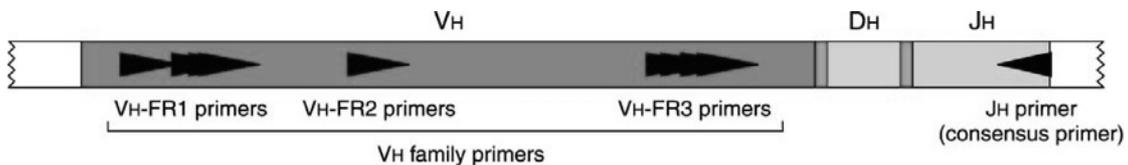
Da es sich bei dem IdentiClone™ Gene Clonality Assays laut Firma um robuste Systeme handelt und während der Amplifikation eine Kontrolle (Specimen Control Size Ladder

master mix) erfolgt, die sicherstellt, dass DNA in ausreichender Qualität und Quantität vorhanden ist, konnten auch angrenzende Konzentrationen toleriert werden.

Der Absorptionsquotient A260/A280 sollte für eine reine DNA etwa 1,8 - 2,0 betragen.

2.7.3 Testung auf Rekombinationen in den Schwerketten- sowie Leichtkettengen der Immunglobuline

Um die rekombinanten Genprodukte der Immunglobulin Schwerketten (V_H - J_H und D_H - J_H) zu amplifizieren wurde das IdentiClone™ IGH Gene Clonality Assay verwendet. Dieses stellt Mixturen für fünf unterschiedliche Ansätze bereit. In den ersten drei Ansätzen (Master Mix Tube A, B, C) werden DNA-Abschnitte zwischen zwei Primern amplifiziert, die zum einem an einen der drei Strukturregionen (FR1, FR2 und FR3) der variablen Region (V_H) binden und zum anderen an den Verbindungsbereich (J_H).



Tube A: 6 V_H-FR1 Primers + J_H Consensus Primer

Tube B: 7 V_H-FR2 Primers + J_H Consensus Primer

Tube C: 7 V_H-FR3 Primers + J_H Consensus Primer



Tube D: 6 D_H Primers + J_H Consensus Primer

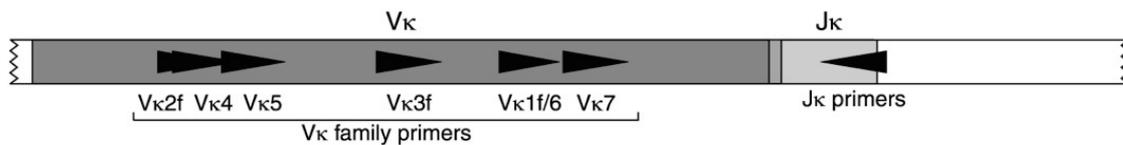
Tube E: D_H7 Primer + J_H Consensus Primer

Abbildung 7: Schematische Darstellung eines rekombinanten Schwerketten-Genabschnitts auf Chromosom 14 und Ansatzstellen der Primer in den Ansätzen A-E des IdentiClone™ IGH Gene Clonality Assays (in Anlehnung an (van Dongen et al., 2003))

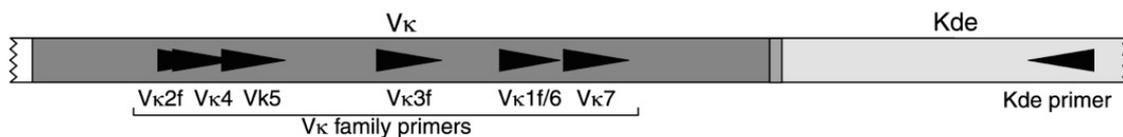
In den Ansätzen D und E (Master Mix Tube D und E) binden Primer an die Diversitäts- (diversity)-Region (D_H) und die Verbindungsregion (J_H) des Schwereketten-Gens (siehe Abbildung 7).

Die Erfassung neu angeordneter Gene im Genabschnitt für Immunglobulin- κ -Leichtketten erfolgt mittels IdentiClone™ IGK Gene Clonality Assay. Ansatz A (Master Mix IGK Tube A) und beinhaltet sechs Primer, die jeweils an verschiedene Stellen der variablen Region (V_κ) binden und zwei Primer, die an die Verbindungsregion (J_κ) binden.

Der zweite Ansatz B (IGK Master Mix Tube B) wiederum amplifiziert Genabschnitte die zwischen Primern der variablen Region (V_κ) und der κ -Löschregion (κ_{de}) oder zwischen der intragenetischen Region J_κ - C_κ und der κ -Löschregion (κ_{de}) liegen (siehe Abbildung 8).



IGK tube A: 6 V_κ primers + 2 J_κ primers



IGK tube B: 6 V_κ primers and INTR primer + 1 Kde primer



Abbildung 8: Schematische Darstellung eines κ -Leichtketten Genabschnitts auf Chromosom 2q11.2 und relative Ansatzstellen der Primer in den Ansätzen A und B des IdentiClone™ IGK Gene Clonality Assays (in Anlehnung an (van Dongen et al., 2003))

Zur Durchführung der oben genannten PCR-Ansätze wurde im ersten Schritt 22,5 μ l des jeweiligen Master Mix (IGH Tube A-E oder IGK A, B) mit 0,125 μ l AmpliTaq Gold

DNA-Polymerase (der Firma Applied Biosystems) versehen und in eine 96er Wellplatte pipettiert. Im Anschluss wurde 2,5 µl der zu untersuchenden DNA-Probe mit einer angestrebten Konzentration von 100-400 µl/ml dem Gemisch unter Resuspension hinzugefügt. Um möglicherweise entstandene Luftblasen zu entfernen, wurde die Platte nachfolgend zentrifugiert. Die Amplifikation fand dann im GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) statt, in dem die Proben folgendem Temperaturzyklus unterlagen: 1) 95°C für 7 Minuten, 2) 95°C für 45 Sekunden, 3) 60°C für 45 Sekunden, 4) 72°C für 90 Sekunden, 5) Schritt 2.-4. in 34-facher Wiederholung, 6) 72°C für 10 Minuten, 7) 15°C bis Probenentnahme. Alle DNA-Proben sind einfach bestimmt worden. Bei jedem PCR-Ansatz sind eine Positiv-, Negativ- und Leerkontrolle (H₂O) für die Master-Mixe und eine Probenkontrolle (Specimen Control Size ladder) erfolgt. Die Probenkontrolle ist ein Master Mix, der einzelne Exons vier verschiedener Gene erfasst. Somit kann sichergestellt werden, dass die DNA in den Proben in ausreichender Quantität und Qualität vorgelegen hat.

Um die fertigen PCR-Produkte analysieren zu können, wurde je 1 µl PCR-Produkt 10 µl stark entionisiertes Formamid mit ROX Size Standard (Firma InVivoScribe Technologies) hinzugefügt. Diese Mischung wurde für zwei Minuten bei 95°C inkubiert und danach rasch auf Eis abgekühlt, was zur Ausbildung von Einzelsträngen führte. Die Fraktionierung, Detektion und Analyse dieser einzelsträngigen DNA-Produkte fand im Kapillarelektrophoresegerät ABI 3130 (Firma Applied Biosystem) statt. Während sich die DNA in einer Kapillare in einem elektrischen Feld Richtung Anode bewegt, wird sie von beidseits einfallenden Laserstrahlen angeregt. Die fluoreszenz-markierten Primer in den DNA-Produkten werden angeregt und erzeugen je nach Farbstoff ein anderes Emissionsspektrum, welches wiederum detektiert wird. Die Daten werden vom ABI 3130 automatisch angezeigt und stellen sich als farb- und größenspezifische Peaks dar.

2.7.4 Auswertung der IdentiClone™-Daten

Zur Sicherung und Interpretation der Muster wurden die Daten mit der Peakscanner™ Software v1.0 (Firma Applied Biosystems) betrachtet.

Da die rekombinanten Immunglobulin-Gene in ihrer Länge und Sequenz spezifisch sind für einzelne B-Zellen eines Klons, zeigten sich bei Vorliegen einer monoklonalen B-Zell-

Population ein oder zwei prominente Amplifikationsprodukte, die als *Peaks* sichtbar wurden (siehe Abbildung 9).

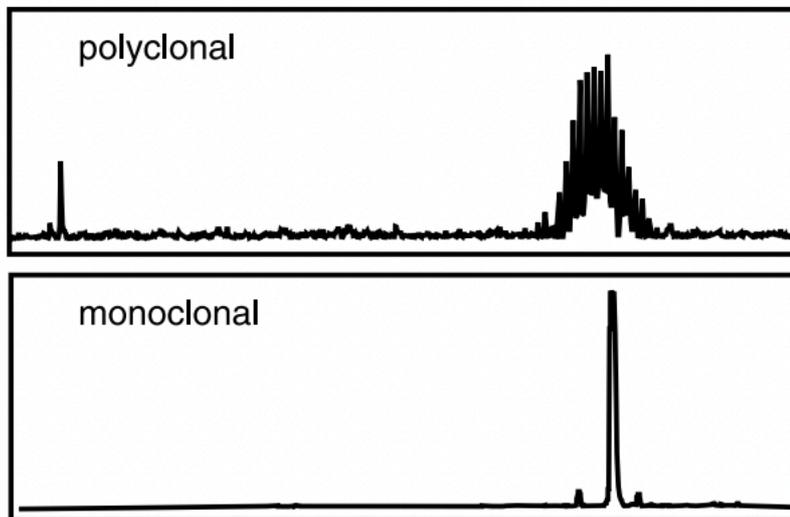


Abbildung 9: Schematische Darstellung von monoklonalen und polyklonalen Amplifikationsprodukten (van Dongen et al., 2003))

Im Gegensatz dazu stellte sich eine Normal- oder polyklonale Population als glockenförmige Kurve (Gaußsche Verteilungskurve) dar, welches die Vielzahl der unterschiedlichen Amplicons widerspiegelt. Die zu erwartenden Größenbereiche der PCR-Produkte variieren je nach Master Mix und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zu erwartende Längenbereiche der Amplicons bei IdentiClone™ IGH und IGK Gene Clonality Assay

Master Mix	Zielregion	Erwartete Produktlänge (bp)
IGH Tube A	FR1-JH	310-360
IGH Tube B	FR2-JH	250-295
IGH Tube C	FR3-JH	100-170
IGH Tube D	DH-JH	110-290, 390-420
IGH Tube E	DH7-JH	100-130
IGK Tube A	V _κ -J _κ	120-160, 190-210, 260-300
IGK Tube B	V _κ -kde, INTR-kde	210-250, 270-300, 350-390
Specimen control ladder	Exons vier verschiedener Gene	100, 200, 300, 400, 600

Ein positiver Peak wurde definiert als ein Amplifikationsprodukt, das in den für den jeweiligen Master Mix gültigen Größenbereich fiel und dessen Amplitude mindestens dreimal höher war, als der dritthöchste Peak der polyklonalen Hintergrundprodukte.

Sind in einer DNA-Probe schließlich ein oder zwei positive Peaks nachgewiesen worden, wurde diese als *positiv* für das Vorliegen einer monoklonalen Ig-Genkombination und folglich *positiv* für das Vorliegen einer monoklonalen B-Zellpopulation bezeichnet. Proben mit prominenten Peaks, die herausstachen, aber die Kriterien eines positiven Peaks nicht erfüllten, wurden als *suspekt* bezeichnet.

Negativ waren jene Proben, die entweder keine Peaks oder Peaks außerhalb des gültigen Größenbereiches aufwiesen.

Die PCR konnte bei 104 HCV-positiven und 53 Proben einer dem Geschlecht und Alter vergleichbaren HCV-negativen Kohorte durchgeführt werden. Da die Ansätze Tube A, B, E der Schwereketten- sowie Tube A und B der Leichtketten- keine monoklonalen B-Zell-Populationen detektieren konnten, welche in den Ansätzen C und D nicht nachgewiesen wurden, wurde nach 76 Proben auf diese verzichtet.

2.8 Statistische Auswertung

Daten kontinuierlicher Variablen wurden als Median mit dazugehörigen Gültigkeitsbereich angegeben, wohingegen Daten kategorialer Variablen in Prozent ausgedrückt wurden. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurden die Programme SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, München) oder Microsoft Excel (Microsoft Office) verwendet. Wurden zwei kategorische Variablen einander gegenübergestellt, wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Um herauszufinden, ob sich die Häufigkeitsverteilung einer kategorialen von einer theoretisch angenommenen Verteilung unterscheidet, wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt. Zur Berechnung der Korrelation zweier kontinuierlicher, unabhängiger Variablen wurde der Median Test herangezogen. Eine einfaktorielle Varianzanalyse wurde angewendet um zu prüfen, ob drei oder mehrere Gruppen sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Immunglobulinveränderungen

Betrachtet man die Messung der freien Leichtketten und die Serumgelelektrophorese zusammen, konnten in 155/325 Fällen eine monoklonale oder polyklonale Auffälligkeit detektiert werden. Dies entspricht 47,7% der Kohorte (siehe Abbildung 10).

Monoklonale Veränderungen, entweder durch die freie Leichtkettenmessung oder via Immunfixation konnten in 16 Fällen (4,9%) nachgewiesen werden. In drei Fällen wurde sowohl eine MGUS, als auch eine monoklonale Leichtkettenerhöhung nachgewiesen.

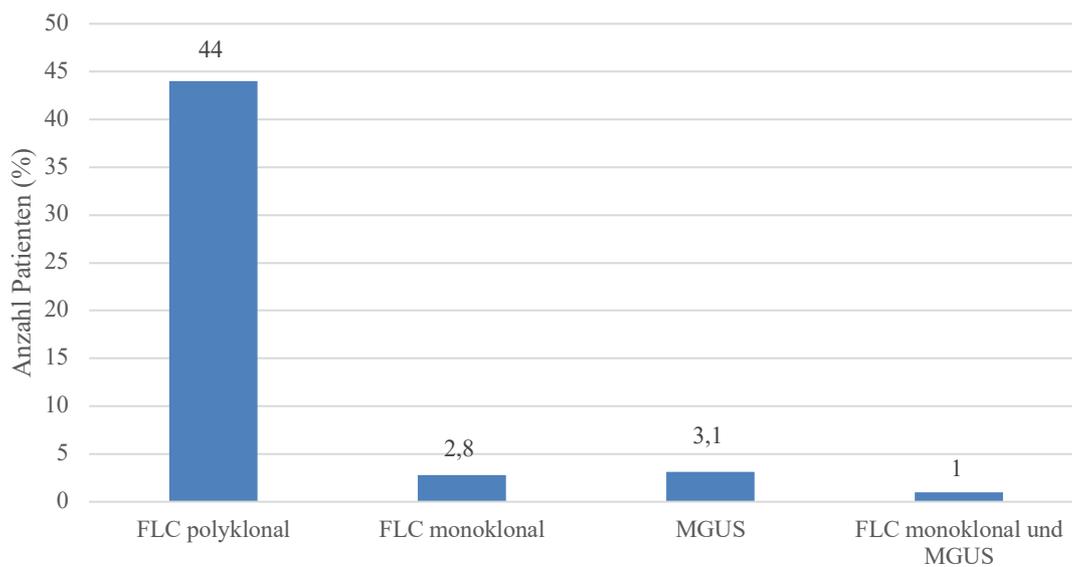


Abbildung 10: Anteil der monoklonalen und polyklonalen Immunglobulinveränderungen nachgewiesen durch FLC-Messung oder Immunfixation (in %), FCL= freie Leichtketten, MGUS= monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz

Die folgende Tabelle 5 stellt die monoklonalen und polyklonalen Veränderungen im untersuchten Kollektiv dar.

Tabelle 5: MGUS und FLC im untersuchten Patientenkollektiv

	MGUS (n=10)	%	FLC Monoklonal (n=9)	%	FLC Polyklonal (n=143)	%
HIV koinfiziert (n=33)	2	20	1	11,1	28	19,6
Männlich	8	80	5	55,6	84	58,7
Weiblich	2	20	4	44,4	59	41,3
Altersdurchschnitt	51,1		49,7		53,9	
HCV Genotyp 1	6/9	66,7	6/7	85,7	86/113	76,1
HCV Genotyp 2	0/9	0	0/7	0	0/113	0
HCV Genotyp 3	2/9	22,2	1/7	14,3	24/113	21,2
HCV Genotyp 4	1/9	11,1	0/7	0	3/113	2,7
HCV Vortherapie	5/7	71,4	4/6	66,7	35/86	40,7
HCV Therapieversager	0/6	0	1/4	25,0	2/35	5,7
CD19 Zell Immu pathologisch	n.d.	n.d.	0/3	0	7/15	46,7
CD19 Zell Immu pathologisch erhöht	n.d.	n.d.	0/3	0	2/15	13,3
CD19 Zell Immu pathologisch erniedrigt	n.d.	n.d.	0/3	0	5/15	33,3

3.1.1 Messung der freien Leichtketten

Betrachtet man die Ergebnisse der κ -Leichtketten wurden in 183/325 Fällen, somit bei über 50% der Patienten, Abweichungen von den Normwerten gemessen. Der Durchschnitt lag hierbei bei 27,10 mg/l (siehe Abbildung 11).

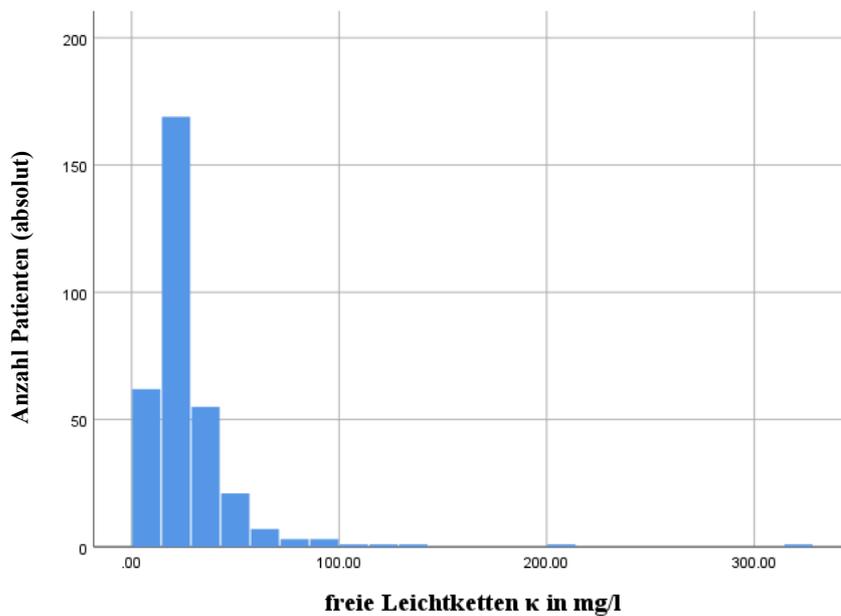


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der freien Leichtkette κ (95%-Referenzintervall der Normwerte der κ -Leichtketten: 3,3 – 19,4 mg/l)

Bei der Messung der λ -Leichtketten kam es in 129 Fällen zu einer Abweichung der oben aufgeführten Normwerte. Der Median betrug 35,13 mg/l (siehe Abbildung 12).

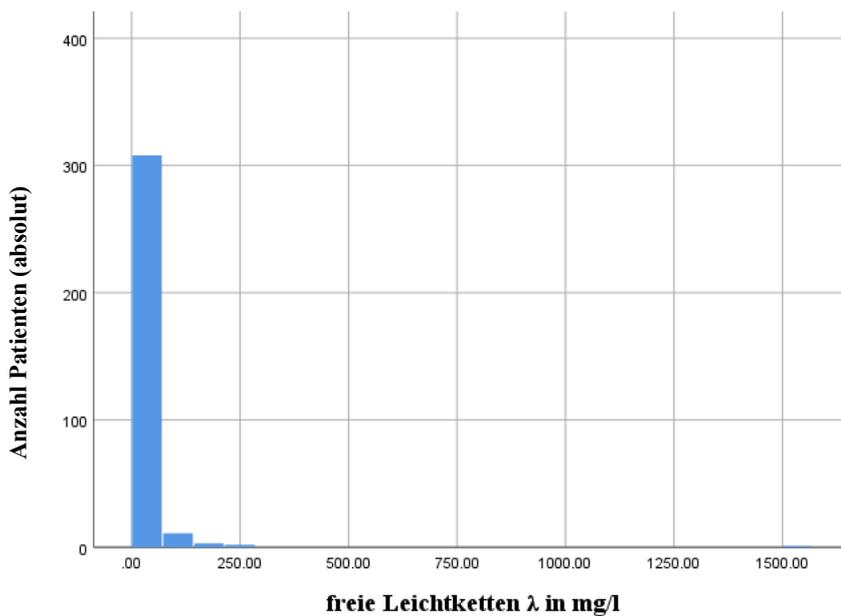


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der freien Leichtkette λ (95%-Referenzbereich der Normwerte der λ -Leichtketten: 5,7 – 26,3 mg/l)

Als Indikator für eine polyklonale B-Zell-Expansion wurden die Summen beider FLC-Subtypen betrachtet. Erwies sich die Summer beider Leichtketten als erhöht (> 45,7 mg/l) ohne eine Verschiebung des κ/λ -Verhältnisses nach sich zu ziehen, wurde dies als polyklonale Leichtkettenerhöhung gewertet. Dies konnte in 143 Fällen festgestellt werden (44%).

Der gemessene Höchstwert betrug 1533,60 mg/l.

In 9 Fällen konnte ein abnormales Verhältnis der Leichtketten κ/λ nachgewiesen werden, was für eine monoklonale Erhöhung der κ - oder λ -Leichtketten spricht (Normbereich: 0,26 – 1,65). Die höchste Abweichung lag bei einer κ/λ -Ratio von 2,99.

Bei insgesamt 173 Proben wurden weder polyklonale noch monoklonale Auffälligkeiten beobachtet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Mono- und polyklonale FCL-Veränderungen in der Patientenkohorte (FLC=freie Leichtketten, CD= cluster of differentiation)

FLC	Monoklonal (n=9)	%	Polyklonal (n=143)	%	Keine Veränderungen (n=173)	%
HIV koinfiziert (n=33)	1	11,1	28	19,6	4	2,3
Männlich	5	55,6	84	58,7	106	61,3
Weiblich	4	44,4	59	41,3	67	38,7
Altersdurchschnitt	49,7		53,9		47,2	
HCV Genotyp 1	6/7	85,7	86/113	76,1	106/151	70,2
HCV Genotyp 2	0/7	0	0	0	4/151	2,6
HCV Genotyp 3	1/7	14,3	24/113	21,2	37/151	24,5
HCV Genotyp 4	0/7	0	3/113	2,7	4/151	2,6
HCV Vortherapie	4/6	66,7	35/86	40,7	57/126	45,2
HCV Therapieversager	1/4	25,0	2/35	5,7	14/57	24,6
CD19 Zell Immu pathologisch	0/3	0	7/15	46,7	19/46	41,3
CD19 Zell Immu pathologisch erhöht	0/3	0	2/15	13,3	9/46	19,6
CD19 Zell Immu pathologisch erniedrigt	0/3	0	5/15	33,3	10/46	21,7

Vergleicht man die Merkmale innerhalb der Gruppen mit monoklonalen, polyklonalen oder keinen Veränderungen der FLC, fällt auf, dass der Genotyp 1 des Hepatitis-C-Virus in der Gruppe mit monoklonalen Veränderungen häufiger vertreten ist gegenüber der Gruppe ohne FLC-Veränderungen oder mit polyklonalen Veränderungen. Betrachtet man

die prozentuelle Verteilung des Genotyps 3 verhält es sich genau gegensätzlich. Dieser ist am niedrigsten repräsentiert in der Gruppe der monoklonalen Veränderungen (siehe Tabelle 6).

Betrachtet man es aus der Sicht der Genotypen, konnte beim Genotyp 1 in 12/198 (6,1%) der Fälle und beim Genotyp 3 in 3/60 (5%) der Fälle eine monoklonale Veränderung detektiert werden.

3.1.2 Serumgelelektrophorese und Immunfixation

In 10 von 325 Fällen konnte eine monoklonale Fraktion (M-Protein) im Serum und damit eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) nachgewiesen werden, was 3,1 % der Kohorte entspricht. Davon war IgM mit 40% am häufigsten vertreten. Betrachtet man die Leichtketten, wiesen 70% den Subtyp λ und 30% den Subtyp κ auf. In den klinischen sowie paraklinischen Untersuchungen dieser Patienten ergab sich kein Anhalt auf das Vorliegen einer Lymphomerkrankung oder eines Multiplen Myeloms. Die Charakteristika der Patienten mit einer MGUS sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: MGUS (monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz) in der Patientenkohorte (LK= Leichtkette, Ig= Immunglobulin, FLC= freie Leichtketten)

	Patienten (n=10)	%
Subtyp mit LK kappa	3/10	30,0
Subtyp mit LK lambda	7/10	70,0
Subtyp IgG	2/10	20,0
Subtyp IgA	3/10	30,0
Subtyp IgM	4/10	40,0
Subtyp IgD/E	1/10	10,0
FLC > oberer Grenzwert (45,7 mg/l)	7/10	70,0
FLC Ratio erhöht	1/10	10,0
FLC Ratio erniedrigt	2/10	20,0
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal)	4/10	40,0
HCV Genotyp 1a	4/9	44,4
HCV Genotyp 1b	2/9	33,3
HCV Genotyp 3a	2/9	33,3
HCV Genotyp 4	1/9	11,1
HIV koinfiziert	2/10	20,0
Männlich	8/10	80,0
Weiblich	2/10	20,0
Durchschnittsalter	51,1 Jahre	
Durchschnittsalter Männer	48 Jahre	
Durchschnittsalter Frauen	63,5 Jahre	

In 30% der Fälle, die in der Immunfixation eine MGUS aufwiesen, konnte auch in der FLC-Messung ein abnormales Verhältnis der freien Leichtketten κ/λ zueinander und damit eine monoklonale Erhöhung nachgewiesen werden.

Bei weiteren vier Patienten, und damit 40%, in deren Seren eine MGUS nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in der FLC-Messung eine polyklonale Leichtkettenerhöhung. In 6 von 9 Fällen, in denen eine monoklonale Leichtkettenerhöhung detektiert wurde, erwies sich die Immunfixation als unauffällig. In drei Fällen konnte eine monoklonale Fraktion festgestellt werden.

3.2 Kryoglobulinämie

Es fanden sich 6/24 Fälle mit Kryoglobulinämie. In einem dieser sechs Fälle konnte auch bei der Serumproteingelelektrophorese ein M-Protein nachgewiesen werden (vergleiche Tabelle 8). In der angeschlossenen Immunfixation wurde IgM λ detektiert.

Tabelle 8: Kryoglobuline in der Patientenkohorte (FLC=freie Leichtkette, MGUS= monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, PCR= Polymerase-Kettenreaktion)

	Nachweisbar (n=6)	%	Nicht nachweisbar (n=18)	%
HIV koinfiziert	0	0	0	0
Männlich	3	50,0	12	61,1
Weiblich	3	50,0	6	38,9
Altersdurchschnitt	55		48,8	
HCV Genotyp 1a	2/6	33,3	7/16	43,8
HCV Genotyp 1b	4/6	66,7	7/16	43,8
HCV Genotyp 3a	0/6	0	2/16	12,6
HCV Genotyp 4	0/6	0	0/16	0
MGUS	1	0	0	0
HCV Vortherapie	2/6	33,3	5/17	29,4
HCV Therapieversager	0	0	0	0
PCR auffällig	2/6	33,3	3/17	17,6
FLC Summe erhöht	5	83,3	6	33,3
FLC Ratio erhöht	0	0	0	0
FLC Ratio erniedrigt	0	0	1	5,6
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal)	5	83,3	6	33,3

Betrachtet man die freien Leichtketten bei allen 24 Proben, fällt auf, dass in 83,3% der Fälle mit einer Kryoglobulinämie eine polyklonale FLC-Erhöhung sichtbar ist. In 93,8% der Fälle, in denen keine Kryoglobulinämie dargestellt werden konnte, wurde auch bei der Leichtkettenmessung keine polyklonale Erhöhung nachgewiesen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz dieser Beobachtung wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson herangezogen, welcher mit einem Signifikanzwert von $p=0,005$ eine signifikante Korrelation aufzeigte.

Eine monoklonale FLC-Ratio wurde in keinem der Fälle detektiert.

Bei 23/24 Proben wurde eine IGHV-PCR durchgeführt (Identiclone). Unter den Patienten mit nachgewiesenen Kryoglobulinen zeigte sich in zwei Fällen ein suspekter Peak in der PCR.

3.3 Immunphäotypisierung

Eine monoklonale B-Zell-Population im Sinne einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) wurde in 24 Fällen (36,4%) der HCV-positiven Kohorte und in 4 Fällen (7,5%) der HCV-negativen Kohorte detektiert. Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson konnte mit einem Signifikanz-Wert von $p<0,001$ ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HCV-Kohorte und der gegenübergestellten Gruppe der Normalspender berechnet werden.

Die 24 Fälle von MBL, die der HCV-positiven Kohorte entstammten sowie die vier Fälle der HCV-negativen Kontrollgruppe wiesen allesamt den Immunphäotyp $CD19^+CD5^+$ auf und wurden als *atypical CLL-like MBL* klassifiziert. In drei Fällen der HCV-Kohorte entstammenden MBL-Fälle konnte zudem ein Immunphäotyp $CD19^+5^-$ nachgewiesen werden, welche den *Non-CLL-MBL* untergeordnet werden (Marti et al., 2007).

Tabelle 9: MBL (monoklonale B-Lymphozytose) in der Patientkohorte. Alters- und geschlechtsbezogene Normalspender dienten als Kontrollen (CD= *cluster of differentiation*, PCR= polymerase Kettenreaktion, FLC= freie Leichtketten, MGUS= monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz)

	Patienten	%
<u>HCV Patienten</u>	n=24	
CD19 ⁺ 5 ⁺	24/24	100
CD19 ⁺ 5 ⁻	3/24	12,5
PCR monoklonaler Peak	2/24	8,3
PCR suspekter Peak	3/24	12,5
FLC Summe erhöht	4/23	17,4
FLC Ratio erhöht	0	0
FLC Ratio erniedrigt	0	0
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal)	4/23	17,4
MGUS	0	0
HCV Genotyp 1a	4/21	19,0
HCV Genotyp 1b	8/21	38,1
HCV Genotyp 3a	7/21	33,3
HCV Genotyp 4	1/21	4,8
Männlich	16/24	66,6
Weiblich	8/24	33,3
Alter	22-76	
Durchschnittsalter Männer (Jahre)	49,7	
Durchschnittsalter Frauen (Jahre)	51,7	
HCV Vortherapie	15/21	71,4
Anzahl Vortherapien	1-3	
Therapiedauer	3 – 36 Monate (Durchschnitt: 8,3)	
Abstand zum Therapieende (Monate)	1-118 Monate	
Therapieversager	8/21	38,1
<u>Normalspender</u>	n=4	
Männlich	3/4	75
Weiblich	1/4	25
Alter	28-52	
Durchschnittsalter Männer (Jahre)	44,3	
Durchschnittsalter Frauen (Jahre)	28	

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei 104 Proben der HCV-positiven und 53 Proben einer dem Geschlecht und Alter vergleichbaren HCV-negativen Kohorte wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. In 11 Fällen konnte eine monoklonale B-Zell-Population nachgewiesen werden, alle Fälle entstammten der HCV-positiven Kohorte.

Ein suspekter Peak wurde in 8 Fällen sichtbar. Auch diese entstammten allesamt der HCV-positiven Kohorte. Bei Analyse der DNA der HCV-negativen Vergleichsgruppe wurde kein suspekter Peak detektiert (siehe Abbildung 13). Bei Vergleich der HCV-Kohorte mit den Normalspendern zeigte sich im Chi-Quadrat-Test ein signifikanter statistischer Zusammenhang ($p=0,004$).

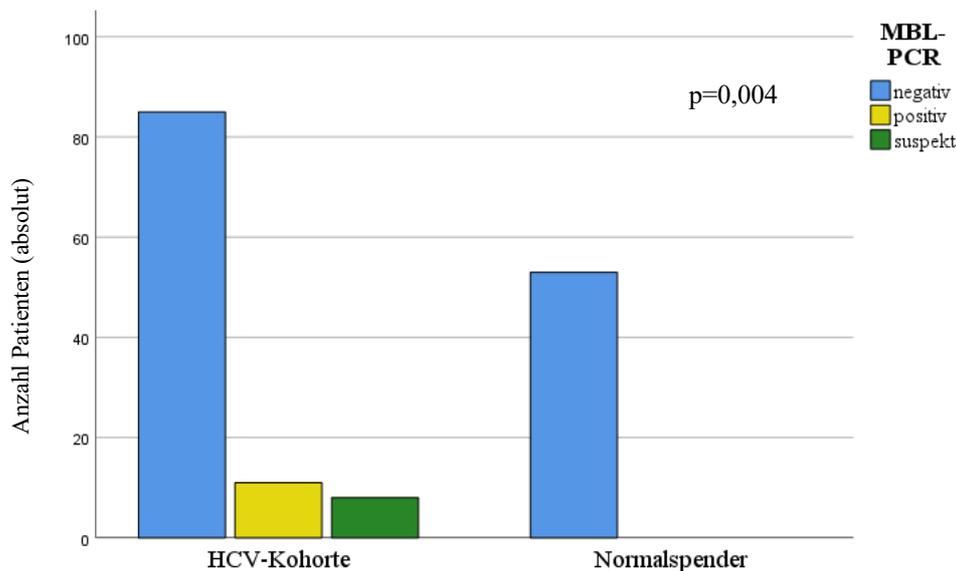


Abbildung 13: PCR-Ergebnisse (Fragmentlängenanalyse) der Proben der HCV-Kohorte. Alters- und geschlechtsbezogene Normalspender dienten als Kontrollen. MBL= monoklonale B-Lymphozytose, PCR= Polymerase-Kettenreaktion

Die Charakteristika der Patienten mit einer monoklonalen, als auch einer suspekten B-Zell-Population gemeinsam ($n=19$) sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: MBL und auffällige Fragmentlängenanalyse (PCR) in der Patientenkohorte (MBL= monoklonale B-Lymphozytose, PCR= Polymerase-Kettenreaktion, FLC= freie Leichtketten, MGUS= monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, CD= *cluster of differentiation*, ULN= *upper limit of normal*)

	Patienten (n=19)	%
PCR monoklonaler Peak	11/19	57,9
PCR suspekter Peak	8/19	42,1
FLC > oberer Grenzwert (45,7 mg/l)	6/19 (3/11)	31,6 (27,3)
FLC Ratio erhöht	0	0
FLC Ratio erniedrigt	1/19 (1/11)	5,3 (9,1)
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal)	5/19 (3/11)	26,3 (27,3)
MGUS	0	0
HCV Genotyp 1a	8/16	50,0
HCV Genotyp 1b	4/16	25,0
HCV Genotyp 3a	3/16	18,8
HCV Genotyp 4	1/16	6,3
Männlich	12/19 (7/11)	63,2 (63,6)
Weiblich	7/19 (4/11)	36,8 (36,4)
Alter	31-70/ 15, 31-59/11	
Durchschnittsalter Männer (Jahre)	44,3 (45)	
Durchschnittsalter Frauen (Jahre)	50,3 (48,3)	
HCV Vortherapie	6/19 (4/11)	31,6 (36,4)
Anzahl Vortherapien	1	
Therapiedauer	3 – 13 Monate (Durchschnitt: 8,8)	
Abstand zum Therapieende (Monate)	2-96 Monate	
Therapieversager	4/15 (3/11)	26,7 (27,3)

Bei den 11 Proben, bei denen via PCR eine monoklonale B-Zell-Population detektiert werden konnte, wurde in 6 Fällen auch eine Immunphäotypisierung durchgeführt, in der in einem Fall auch eine MBL aufgezeigt werden konnte.

In den 8 Fällen, in denen ein suspekter Peak sichtbar wurde, konnte in 4 Fällen auch eine Immunphäotypisierung durchgeführt werden, in der sich in 3 Fällen eine MBL zeigte.

3.5 Besonderheiten HIV-koinfizierter Patienten

Nach Messung der freien Leichtketten bei 33 HIV/ HCV-koinfizierter Patienten zeigte sich erstaunlicherweise bei 28 eine polyklonale B-Zellexpansion. Dies entspricht 84,8%. Bei den Patienten ohne eine HIV-Koinfektion fanden sich 39,2% (siehe Abbildung 14).

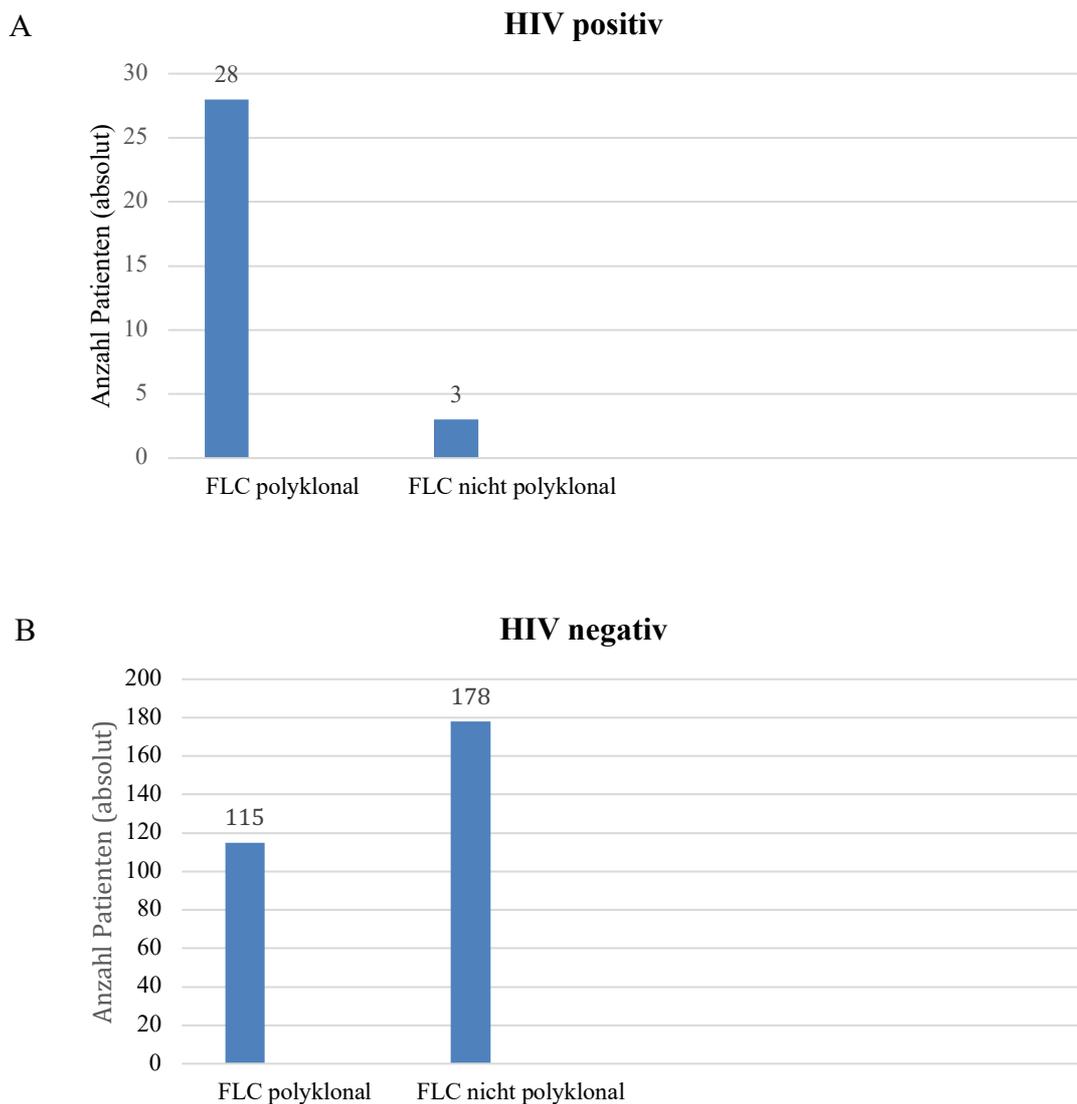


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Fälle mit einer polyklonalen FLC-Veränderung bezüglich einer Koinfektion mit HIV (A: HIV positiv; B: HIV negativ, FLC= freie Leichtketten)

In einem Fall mit einer HIV-Koinfektion wurde eine Abweichung des κ/λ -Verhältnisses im Sinne einer monoklonalen B-Zell-Expansion sichtbar. Bei Betrachtung der absoluten

Zahlen der Leichtkettensummen fielen insgesamt hohe Werte bei Höchstwerten von bis zu 289,70 mg/l bei einer Obergrenze der Normwerte von 45,7 mg/l auf. Der Mittelwert der summierten Leichtketten lag bei 88,25 mg/l. Im Vergleich dazu lag der Mittelwert der summierten Leichtketten nicht HIV-koinfizierter Probanden bei 59,28 mg/l. Eine graphische Gegenüberstellung der summierten Leichtketten beider Gruppen zeigt Abbildung 15.

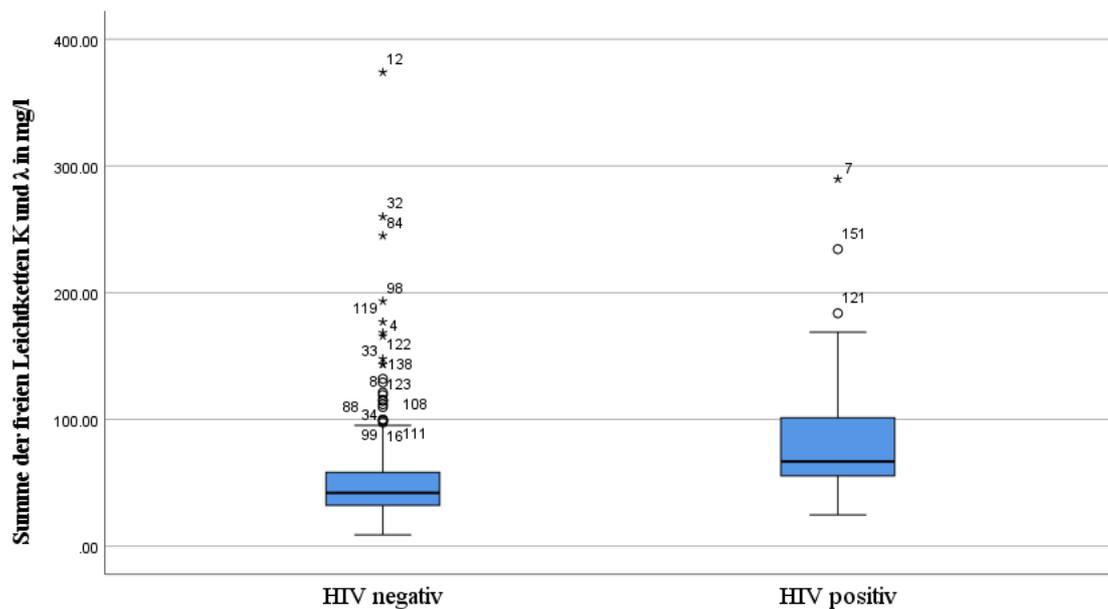


Abb. 15: Graphische Darstellung der freien Leichtkettensummen (in mg/l) der Gruppen HIV positiv gegenüber HIV negativ

Bei der statistischen Prüfung auf einen signifikanten Unterschied der Summen beider Gruppen wurde der Median-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Mit einem Signifikanzwert von $p < 0,001$ konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der Leichtkettensummen HIV-koinfizierter Patienten gegenüber nicht HIV-koinfizierter Probanden belegt werden.

Durch die Immunfixation konnten in zwei Fällen eine MGUS nachgewiesen werden, welches 6,1% der HIV-koinfizierten Fälle ausmacht. Im Vergleich dazu liegt der Anteil der MGUS bei der gesamten Kohorte lediglich bei 3,1 %.

Tabelle 11 zeigt eine Gesamtübersicht der HIV-koinfizierten Probanden.

Tabelle 11: Patientencharakteristika der HIV-koinfizierten Patienten (FLC= freie Leichtketten, MGUS= monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz)

	Patienten (n=33)	%
Männlich	23/33	69,7
Weiblich	10/33	30,3
Altersdurchschnitt	44,2	
Durchschnittsalter Männer	42,5	
Durchschnittsalter Frauen	48	
HCV Genotyp 1*	24/30	80,0
Genotyp 1a	19/30	63,3
Genotyp 1b	5/30	16,7
HCV Genotyp 3a	5/30	16,7
HCV Genotyp 4	1/30	3,3
HCV Vortherapie	3/16	18,8
HCV Therapieversager	0	0
MGUS	2/33	6,1
FLC > oberer Grenzwert (45,7 mg/l)	29/33	87,9
FLC Ratio erhöht	0/33	0
FLC Ratio erniedrigt	1/33	3,0
FLC erhöht (polyklonal, Ratio normal)	28/33	84,8

3.6 Einfluss einer antiviralen Therapie auf die Serumalterationen

Unter den betrachteten 33 Patienten befanden sich 23, welche nach Abschluss der antiviralen Therapie keine nachweisbare Viruslast im Blut aufwiesen; sprich zur Gruppe der „Responder“ gehörten. Unter diesen zeigten sich vor Beginn der Therapie 6 Patienten (26,1 %), welche eine polyklonale Leichtkettenerhöhung im Serum aufwiesen. Nach Abschluss der Therapie war diese polyklonale Erhöhung noch bei drei Patienten (13,0 %) sichtbar. Eine monoklonale Leichtkettenerhöhung im Sinne eines Abweichens des FLC-Verhältnisses wurde in keinem der Fälle sichtbar. Bei einem Patienten trat erst nach Abschluss der erfolgreichen Therapie ein MGUS in der Immunfixation auf.

Fünf Patienten der betrachteten Kohorte haben nicht auf die antivirale Therapie angesprochen, wurden also der Gruppe der „Non-Responder“ zugeordnet. Eine polyklonale Leichtkettenerhöhung war weder vor noch nach Therapie messbar. In einem Fall war vor der Therapie eine monoklonale Leichtkettenexpansion nachweisbar, welche auch posttherapeutisch persistierte. Bei demselben Patienten zeigte sich auch in der Immunfixation eine MGUS.

Patienten, die zunächst auf die antivirale Therapie ansprachen, dann jedoch im Verlauf einen erneuten Anstieg der Viruslast zeigten, wurden in die Gruppe der „Relapse“ eingeteilt (n=5). Auffällig in dieser Gruppe war, dass vier von fünf Patienten vor Therapiebeginn eine polyklonale Leichtkettenexpansion aufwiesen (80%), welche auch in drei Fällen in der Follow-up-Messung nachweisbar war. Eine monoklonale Leichtkettenerhöhung oder eine MGUS wurde nicht sichtbar.

Vergleicht man die Summen der freien Leichtketten der einzelnen Gruppierungen miteinander, fällt auf, dass der Mittelwert der summierten Leichtketten in der Gruppe der „Non-Responder“ von 59,1 mg/l vor Therapiebeginn auf 75,2 mg/l nach Beendigung der Therapie gestiegen ist, wohingegen die Mittelwerte der Gruppe der „Relapse“ und „Responder“ gesunken sind (vergleiche Tabelle 12).

Tabelle 12: Mittelwerte der freien Leichtkettensummen $\kappa+\lambda$ (mg/l) vor Einleitung einer antiviralen Therapie (T1) und 24 Wochen nach Beendigung einer antiviralen Therapie (T2), aufgeschlüsselt nach *Responder*, *Non-Responder* und *Relapse* (FLC= freie Leichtketten, MW= Mittelwert)

	FLC ($\kappa+\lambda$) absolut T1 (MW in mg/l)	FLC ($\kappa+\lambda$) absolut T2 (MW in mg/l)
Response	39,7	37,5
Non-Response	59,1	75,2
Relapse	58,6	55,3

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Werte der Untergruppe der „Non-Responder“ fällt ein Proband auf, bei dem sich sowohl vor Therapiebeginn (T1) mit 165,87 mg/l als auch nach Beendigung der Therapie (T2) mit 239,00 mg/l Extremwerte messen ließen.

In der unten aufgeführten Abbildung 16 sind die summierten Werte der freien Leichtketten nach Beendigung der Therapie (T2) dargestellt. In der Gruppe der „Responder“ erwiesen sich die Summen der freien Leichtketten zu beiden Messpunkten mit einem Median von 39,7 mg/l (T1) und 37,5 mg/l (T2) von allen Gruppen am niedrigsten.

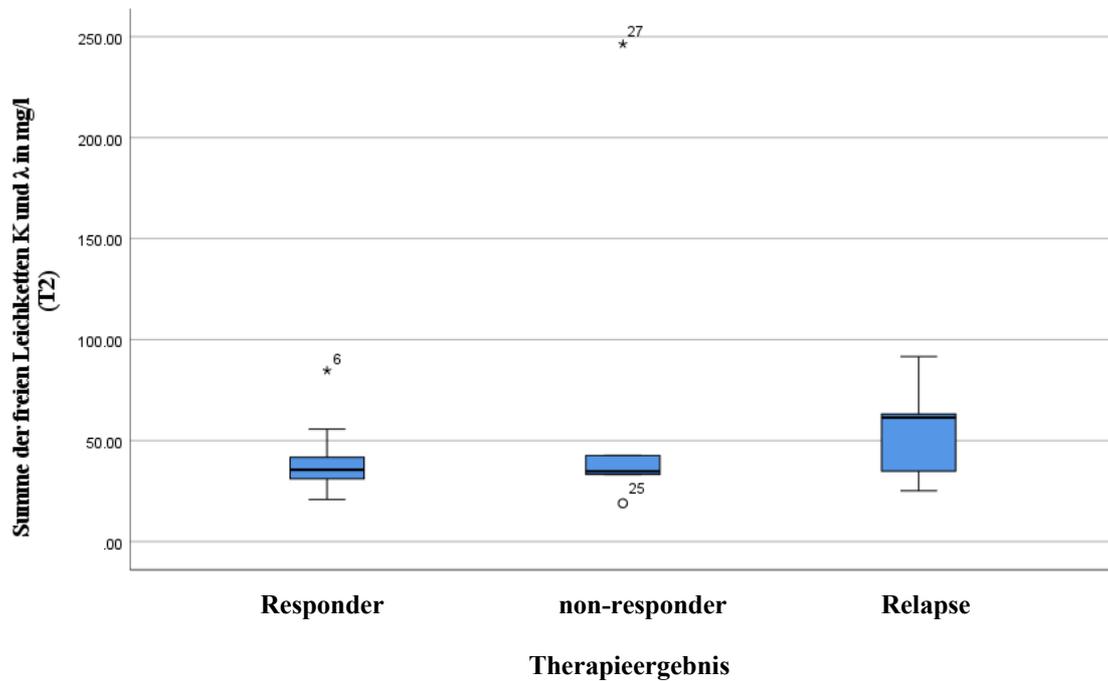


Abbildung 16: Summe der freien Leichtketten $\kappa+\lambda$ (in mg/l) 24 Wochen nach Beendigung einer antiviralen Therapie (T2) je nach Ausgang der Therapie (*Responder*, *non-responder* und *Relapse*)

Um zu detektieren, ob sich die Veränderungen der freien Leichtketten der drei Gruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden und sich der Therapieerfolg in den Veränderungen der freien Leichtketten widerspiegelt, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Obwohl die Graphik Unterschiede andeutet, ist mit einem Signifikanzwert von $p=0,082$ kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen festzustellen. Hierbei ist zu beachten, dass mit 33 Probanden eine kleine Kohorte abgebildet ist.

4 Diskussion

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus ist mit der Entwicklung von lymphoproliferativen Veränderungen der B-Zellen assoziiert. Da die Pathomechanismen von HCV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen nicht vollständig geklärt sind, untersuchten wir monoklonale und polyklonale Immunglobulinveränderungen sowie monoklonale B-Zell-Expansionen als eine Vorstufe von lymphoproliferativen Erkrankungen in einem Kollektiv HCV-infizierter Patienten. Darüber hinaus wurde ein möglicher Einfluss einer antiviralen Therapie und einer Koinfektion mit dem HI-Virus auf die Serumalterationen betrachtet.

Freie Leichtketten haben sich als einen nützlichen Marker erwiesen, deren quantitative Veränderungen mit spezifischen Erkrankungen assoziiert sind. Sie werden als einen direkten Marker für die B-Zell-Aktivität angesehen (Basile et al., 2015). In der hier vorliegenden Arbeit fanden wir sowohl polyklonale (44%), als auch monoklonale (2,8%) FLC-Veränderungen. Weshalb es zu einer monoklonalen oder polyklonalen Expansion kommt, ist nicht gänzlich geklärt. Man geht davon aus, dass durch die chronische HCV-Infektion eine persistente Antigenstimulation herrscht, die in einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung resultiert (Oliveira et al., 2014). Neben der polyklonalen B-Zell-Aktivierung scheint das HC-Virus eine monoklonale B-Zell-Aktivierung zu induzieren, welche in eine B-Zell-Dysregulation mit exzessiver Produktion von Antikörpern übergehen kann. Diese exzessive Produktion spiegelt sich dann in einer abweichenden FLC-Ratio wider, welche durch Messung der freien Leichtketten im Serum früh nachgewiesen werden kann (Terrier et al., 2009).

In einer von Terrier et al. durchgeführten prospektiven Studie war ein Abweichen der FLC-Ratio zu 100% assoziiert mit der Erkrankung an einer kryoglobulinämischen Vaskulitis und zu 40% mit einem B-NHL (Terrier et al., 2009). In einer groß angelegten Studie von Dezzutti et al, in der die Prävalenz von Kryoglobulinen im Serum von HCV-Patienten mit und ohne einer HIV-Koinfektion verglichen wurden, konnte in 19% der HCV-monoinfizierten Kohorte eine Kryoglobulinämie nachgewiesen werden, welches unserem Ergebnis von 25% entspricht (Dezzutti et al., 2004).

Hinsichtlich der freien Leichtketten bei den sechs kryoglobulinämischen Patienten unserer Kohorte fällt auf, dass es im Gegensatz zu den Ergebnissen von Terrier et al. in fünf Fällen (83,3 %) nur zu einer polyklonalen Veränderung kam. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei 24 Fällen um eine im Verhältnis geringe Probandenzahl handelt.

Wurde mittels Serumgelelektrophorese eine monoklonale Bande (M-Protein) sichtbar, wurde im nächsten Schritt zur Charakterisierung der monoklonalen Gammopathie eine Immunfixation angeschlossen. Die Prävalenz von MGUS in der gesunden Normalbevölkerung variiert in der Literatur sehr und wird bei 0,05- 6,1% angegliedert. Diese Variabilität ist mitunter auf eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit, aber auch auf verschiedenen Testmethoden zurückzuführen (Goldin et al., 2013). In der in dieser Arbeit betrachteten Kohorte von HCV-infizierten Patienten konnte in 3,1% eine monoklonale Gammopathie detektiert werden. Darunter befanden sich 40% IgM-MGUS und 60% non-IgM-MGUS. Eine prospektive Studie aus Ägypten, welche das Auftreten von MGUS unter HCV-Patienten untersuchte, weist mit einer Prävalenz von 2% ähnliche Werte auf, wohingegen eine Studie aus den USA mit 13,7% eine deutlich höhere Prävalenz erzielte (Idilman et al., 2004, Tawfik et al., 2013). Letzte schlossen an den Nachweis der MGUS, welchen sie an Serum und Urinproben durchführten, eine Knochenmarkspunktion an, in der sie in 25 % der Fälle eine maligne Plasmazellerkrankung nachweisen konnten (Idilman et al., 2004). Da es sich bei MGUS um monoklonale Antikörper im peripheren Blut handelt, verhärtet sich der Verdacht, dass die Infektion mit HCV eine monoklonale B-Lymphoproliferation mit nachfolgender B-Zell-Dysregulation und exzessiver Produktion monoklonaler Immunglobuline zu induzieren scheint (siehe oben).

Insgesamt ist zu betonen, dass der Entwicklung eines Multiplen Myeloms eine MGUS vorausgeht, umgekehrt das jährliche Fortschreiten einer monoklonalen Gammopathie in eine maligne lymphoproliferative Erkrankung bei lediglich etwa 1,5% liegt (Greenberg et al., 2013, Landgren et al., 2009, Kyle et al., 2011).

Die Messung der freien Leichtketten ist bei der Abschätzung der monoklonalen Expansion ein hilfreiches Mittel und kann somit eine Risikoabschätzung für die Progression von MGUS darstellen (Rajkumar et al., 2005).

In 30% der Fälle, in denen eine MGUS via Immunfixation nachgewiesen werden konnte, wurde in der freien Leichtkettenmessung ein Abweichen der FLC-Ratio festgestellt. Man geht also davon aus, dass für diese Patienten ein höheres Risiko besteht im Verlauf an einer malignen lymphoproliferativen Erkrankung zu erkranken.

Wie bereits oben erläutert ist auch die Entstehung der monoklonalen B-Lymphozytose mit einer HCV-Infektion assoziiert.

Durch die 5-Farben-Durchflusszytometrie, die an 66 HCV-positiven Patientenproben und 53 Proben einer dem Geschlecht und Alter entsprechenden HCV-negativen Kohorte durchgeführt wurde, war in insgesamt 28 Fällen eine MBL nachweisbar. In 24 Fällen (36,4%) entstammten diese der HCV-Kohorte, in 4 Fällen (7,5%) der HCV-negativen Vergleichsgruppe. Statistisch konnte ein signifikant erhöhtes Vorkommen von MBL bei den Patienten mit einer HCV-Infektion gegenüber den Normalspendern nachgewiesen werden. Sowohl die 24 MBL der HCV-positiven, als auch die 4 MBL der HCV-negativen Kohorte konnten anhand ihres Immunphänotypen und der Expression der Oberflächenmarker CD19⁺ sowie CD5⁺ den *atypical CLL-like-MBL* zugeordnet werden. Unter den 24 MBL der HCV-positiven Kohorte konnten zudem 3 MBL identifiziert werden, die zudem das Expressionsmuster CD19⁺5⁻ an ihrer Zelloberfläche trugen und entsprechend dem Subtyp *non-CLL-MBL* zugehörig sind. Vergleicht man diese Daten mit den Daten einer italienischen Studie, welche ebenso eine HCV-positive Kohorte mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von MBL hin untersuchte, werden auch hier ähnliche Daten erzielt. Fazi et al. konnten in 28,5 % der HCV-positiven Probanden eine MBL identifizieren. In der Mehrzahl handelte es sich übereinstimmend um den Subtyp *atypical CLL-MBL* (Fazi et al., 2010).

Bei der Diagnostik von suspekten lymphoproliferativen Erkrankungen ist die PCR-basierte Analyse von rekombinanten Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptor-Genen heute eine wertvolle Technik. Ergänzend zu der fluoreszenz-gestützten Durchflusszytometrie (FACS) wurde auch in der hier aufgeführten Arbeit eine PCR-Analyse durchgeführt, um monoklonale B-Zell-Expansionen nachzuweisen.

Anhand dieser Methodik wurde in 10,6% der HCV-positiven Kohorte eine monoklonale Ig-Genkombination nachgewiesen. In 7,7 % kam es zu einem *suspekten* Ergebnis.

Im Vergleich zur HCV-negativen Kontrollgruppe, in der weder ein positiver, noch *suspekter Peak* detektiert wurde, konnte somit eine höhere Prävalenz monoklonaler B-Zellpopulationen nachgewiesen werden ($p=0,004$). Da die Prävalenz von MBL in der Normalbevölkerung bei 0,5-5% liegt (Rawstron et al., 2008), ist es nicht verwunderlich, bei den 53 HCV-negativen Kontrollpatienten kein MBL zu detektieren. Da mithilfe von FACS jedoch 4 MBL in derselben Kontrollkohorte nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, dass entweder ein Durchführungsfehler besteht oder die MBL mithilfe eines anderen Primer-Ansatzes hätten nachgewiesen werden können.

Da alle monoklonalen Genrekombinationen in zwei der sieben Primer-Ansätze nachgewiesen wurden (Ansätze der Genabschnitte IGH FR3-JH und DH-JH), wurde im Verlauf die PCR-Untersuchung auf diese beiden beschränkt.

Erstaunlicherweise konnte bei dem Vergleich der Ergebnisse der PCR gegenüber der FACS kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Der Grund dafür mag hauptsächlich technischer Natur sein. Während bei FACS die Detektion der klonalen B-Zellen ausschließlich auf einer veränderten FLC-Ratio einer sehr seltenen Lymphozyten-Untergruppe $CD19^+ CD5^+$ basiert, welche in der Regel weniger als 1% der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen, basiert die Klonalitätsbeurteilung durch die PCR auf der DNA-Analyse aller kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes. Ein weiterer Faktor könnte die erhöhte Prävalenz von Dysproteinämien inklusive gemischter Kryoglobulinämien im peripheren Blut der HCV-positiven Kohorte sein, welche mit spezifischen Antikörpern der FACS interagieren und potentiell zu einer erhöhten Anzahl falsch positiver Ergebnisse führen könnte.

Neben der chronischen HCV-Infektion kann auch die Infektion mit HIV zu einer B-Zell-Dysregulation führen, welche in eine polyklonale Hypergammaglobulinämie oder polyklonale B-Zell-Hyperaktivität übergehen kann, aber auch bis hin zum Non-Hodgkin-Lymphom reichen kann (Milazzo et al., 2020). Bei Patienten, welche neben der HCV-Infektion mit HIV koinfiziert sind, haben Studien gezeigt, dass für diese Patienten ein höheres Risiko besteht schneller an Lebererkrankungen mit folgender Zirrhose, HCC oder Leberversagen zu erkranken. Zudem weisen diese Patienten ein verändertes immunologisches Ansprechen auf die antiretrovirale Therapie (ART) auf (Matthews und Dore, 2008). Da ein Teil der hier untersuchten Kohorte neben der Infektion an HCV auch

an HIV infiziert war, wurden Auffälligkeiten der Immunglobulinveränderungen nochmals gesondert betrachtet. Bei 84,8% der HCV/HIV-Koinfizierten wurde in der Messung der freien Leichtketten eine polyklonale Leichtkettenerhöhung im Sinne einer polyklonalen B-Zell-Expansion nachgewiesen. Im Gegensatz dazu betrug der Prozentsatz bei den nicht an dem HI-Virus koinfizierten Patienten 39,2%.

Eine groß angelegte retrospektive Studie aus Italien, in der der Einfluss einer antiviralen Therapie auf die Hypergammaglobulinämie bei HCV- und HCV/HIV-Koinfizierten betrachtet wurde, zeigte, dass durch eine antivirale Therapie (ob Interferon-basiert oder DAA) die Serumspiegel der Gammaglobuline signifikant gesenkt werden können. Dieses Erkenntnis lässt die Annahme zu, dass das HC-Virus eine entscheidende Rolle bei der B-Zell-Aktivierung spielt. Interessanterweise konnten die Forscher hierbei keinen Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne einer HIV-Koinfektion aufzeigen. Ein möglicher Faktor könnte dabei die durch die antivirale Therapie sinkende Viruslast und einhergehende Wiederherstellung des Immunsystems sein (Milazzo et al., 2020).

Auch in der hier durchgeführten Arbeit konnte bei denjenigen Patienten, bei denen die antivirale Therapie erfolgreich war (Responder), im Mittelwert eine Reduktion der freien Leichtkettensummen beobachtet werden. Da es sich bei den beobachteten Patienten jedoch um eine geringe Patientenzahl handelt, sind weitere Studien notwendig, um signifikante Werte zu erzielen.

In Studien von Basile et al. sowie Terrier et al. wurde festgestellt, dass ein Abweichen der FLC-Ratio vor Beginn einer antiviralen Therapie signifikant mit dem Ansprechen auf die Therapie korrelierte. Die Messung der freien Leichtketten, bzw. der FLC-Ratio könnte somit einen prognostischen Marker auf das Ansprechen der oft teuren antiviralen Therapie, bzw. ein alternativer Kontrollmarker für die HCV-assoziierte lymphoproliferative Aktivität nach Beendigung der Therapie darstellen (Terrier et al, 2009, Basile et al., 2015). Um den Einfluss einer antiviralen Therapie auf die freien Leichtketten in der hier eingebrachten Studie nachvollziehen zu können, wurden in 33 Fällen der HCV-Kohorte die FLC-Messung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen, jeweils vor Beginn der Therapie und 24 Wochen nach Beendigung der Therapie. Bei der Messung vor Beginn der Therapie konnte nur in einem Fall ein Abweichen der FLC-Ratio ($\kappa/\lambda=0,04$) nachgewiesen werden. Dieser Patient imponierte

mit einem negativen Ansprechen auf die antivirale Therapie und hatte auch bei der Messung nach Beendigung der Therapie ein Abweichen der FLC-Ratio ($\kappa/\lambda=0,03$). Betrachtet man die addierten Mittelwerte je nach Therapieausgang numerisch, fällt auf, dass die Gruppe, bei der die Therapie angeschlagen hat, vor Therapiebeginn deutlich niedrigere Mittelwerte hatte, als die Gruppe der *Non-responder* oder *Relapse*. Auffällig war darüber hinaus, dass in der Gruppe der Patienten, welche nach anfänglichem Ansprechen auf die antivirale Therapie im weiteren Verlauf einen erneuten Anstieg der Viruslast aufwiesen, also der Gruppe *Relapse* zugezählt wurden, vor Beginn der Therapie zu 80% eine polyklonale Leichtkettenexpansion aufwiesen. In drei von fünf Fällen bestand dieses Abweichen der FLC-Summe auch nach Beendigung der Therapie noch. Eine polyklonale Leichtkettenerhöhung vor Therapiebeginn könnte somit ergänzend zu der FLC-Ratio als ein prognostischer Marker auf das Ansprechen einer antiviralen Therapie dienen, bzw. einen Hinweis darauf geben, ob es im Verlauf zu einem *Relapse* kommt. Angesichts der bereits vorhandenen Erkenntnis, dass bei Patienten mit einer HCV-Infektion, welche zudem an einem Lymphom erkrankt sind, bei einem erfolgreichen Ansprechen auf die antivirale Therapie auch ein Rückgang des Lymphoms beobachtet werden konnte, scheint die Kenntnis über einen prognostischen Marker bzw. einen Marker zur Kontrolle der HCV-assoziierten Lymphoproliferation von entscheidender Bedeutung (Mihäilă, 2016). Eine statistisch signifikante Korrelation der FLC-Level zum jeweiligen Therapieausgang konnte in der hier vorliegenden Patientengruppe nicht erhoben werden. Studien mit größeren Patientenzahlen sind notwendig, um diesen weiter zu verifizieren.

Die Therapieoptionen für eine HCV-Infektion haben sich insbesondere durch Zulassung der direkt antiviral wirkenden Medikamente (DAA) deutlich verbessert. Durch die antivirale Therapie kann, wie oben beschrieben, eine signifikante Senkung der polyklonalen Hypergammaglobulinämie erzielt werden. Es bleibt jedoch unklar, ob durch die chronische Stimulation bereits irreversible Schäden auf molekularer Ebene, wie beispielsweise Genmutationen entstanden sind, die ein persistierendes Risiko für die Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen darstellen. In der hier vorliegenden Arbeit konnte beispielsweise in 10,6% eine monoklonale Ig-Genkombination nachgewiesen werden; in 7,7% kam es zu einem suspekten Ergebnis in der PCR. Ob diese

Rekombinationsmuster reversibel sind oder welchen Einfluss eine antivirale Therapie auf diese ausübt, bedarf weiteren Nachforschungen.

Obwohl viele interventionelle Studien sich mit dem Zusammenhang beschäftigt haben, geschah dies oft durch Auswertung klinischer Kriterien, wohingegen weiterhin wenig bekannt ist über den Zusammenhang auf zellulärer und molekularer Ebene (Schiavinato et al., 2017). Jüngste Studien, welche die monoklonalen und polyklonalen Alterationen des B-Zell-Kompartiments vor und nach einer Therapie mit DAA bei Patienten mit und ohne einer lymphoproliferativen Erkrankung untersuchten, zeigten, dass bei Patienten mit einer lymphoproliferativen Erkrankung durch die Viruseradikation ein signifikanter Rückgang des B-Zell-Kompartimentes beobachtet werden konnte, jedoch in 66,7% ein Persistieren der abnormalen FLC-Ratio besteht. Die Anzahl der pathologischen B-Lymphozyten scheint also durch die Eradikation des Virus herunterzugehen, wohingegen die monoklonalen B-Zell-Populationen im Körper persistieren (Schiavinato et al., 2017). Es besteht die Theorie eines „schlafenden“ Stadiums, indem die Produktion von pathologischen Antikörpern unterdrückt ist (Visentini et al., 2019).

Ähnliche Beobachtungen machten Mazzaro et al, welche nach Viruseradikation bei Patienten mit einer kryoglobulinämischen Vaskulitis nur in 50% eine definitive Besserung der Vaskulitis beobachten konnten (Mazzaro et al., 2021). Dies lässt vermuten, dass das HCV im B-Lymphozytenkompartiment irreversible Schäden induzieren kann, die trotz Viruseradikation persistieren.

5 Zusammenfassung

Das Spektrum lymphoproliferativer Veränderungen ist weit und reicht von einer asymptomatischen monoklonalen B-Zell-Population bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen. Frühe Stadien dieser Erkrankungen sind die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und die monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL). Bei den Risikofaktoren lymphoproliferativer Erkrankungen scheint die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) eine wichtige Rolle zu spielen. Der genaue Mechanismus ist trotz intensiver Forschungsbemühungen nicht hinreichend geklärt. So werden der Einfluss durch die chronische Antigenstimulation, eine direkte B-Zell-Aktivierung, die Infektion der Zelle durch HCV und HCV-induzierte Mutationen diskutiert. Vor diesem Hintergrund geht die hier vorliegende Arbeit dem Ziel nach, monoklonale sowie polyklonale lymphoproliferative Veränderungen im Serum einer HCV-positiven Kohorte von 325 Patienten näher zu beschreiben. So konnten durch verschiedene Untersuchungsmethoden in der HCV-positiven Kohorte monoklonale sowie polyklonale B-Zellexpansionen nachgewiesen werden. Patienten mit einer Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) wurden gesondert betrachtet und fielen im Vergleich mit einer höheren Prävalenz polyklonaler B-Zellexpansionen auf, was den bereits studienbelegten Einfluss von HIV auf die B-Zell-Dysregulation unterstreicht.

Bei Betrachtung der Veränderungen des B-Zell-Kompartimentes vor und nach einer antiviralen Therapie fiel auf, dass das Vorhandensein einer polyklonalen Leichtkettenexpansion zu Therapiebeginn einen negativen Einfluss auf das langfristige Ansprechen zu haben scheint. Da der Vergleich bezüglich der Therapie jedoch nur bei einem geringen Anteil der Kohorte stattfand, bedarf es höheren Patientenzahlen, um signifikante Werte zu erzielen und die Leichtkettenmessung als möglichen prognostischen oder Kontrollmarker zu etablieren.

Obwohl durch die Zulassung der direkt antiviral wirkenden Agenzien (DAA) die Therapieoptionen von HCV deutlich gebessert sind, bleibt es unklar, ob der chronische Stimulus irreversible Schäden verursacht hat.

Erste Studien lassen vermuten, dass HCV Schäden induzieren kann, die trotz Viruseradikation zu persistieren scheinen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alric, L., Besson, C., Lapidus, N., Jeannel, J., Michot, J. M., Cacoub, P., Canioni, D., Pol, S., Davi, F., Rabiaga, P., Ysebaert, L., Bonnet, D., & Hermine, O. (2016). Antiviral Treatment of HCV-Infected Patients with B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: ANRS HC-13 Lympho-C Study. *PloS one*, 11(10), e0162965.
2. Antonelli, A., Ferri, C., Galeazzi, M., Giannitti, C., Manno, D., Mieli-Vergani, G., Menegatti, E., Olivieri, I., Puoti, M., Palazzi, C., Roccatello, D., Vergani, D., Sarzi-Puttini, P., & Atzeni, F. (2008). HCV infection: pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Clinical and experimental rheumatology*, 26(1 Suppl 48), S39–S47.
3. Basile, U., Gragnani, L., Piluso, A., Gulli, F., Urraro, T., Dell'Abate, M. T., Torti, E., Stasi, C., Monti, M., Rapaccini, G. L., & Zignego, A. L. (2015). Assessment of free light chains in HCV-positive patients with mixed cryoglobulinaemia vasculitis undergoing rituximab treatment. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(9), 2100–2107.
4. Behnke AL, Brandl M, Wohlleben J, Harder T, Steffen G, Krings A, Sandfort M, Dudareva S. (2022). *Virushepatitis B und D im Jahr 2021 Epid Bull 2022*; 30:3-21
5. Bortnick, A., & Allman, D. (2013). What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(12), 5913–5918.
6. Burgueño-Bucio, E., Mier-Aguilar, C. A., & Soldevila, G. (2019). The multiple faces of CD5. *Journal of leukocyte biology*, 105(5), 891–904.
7. Brouet, J. C., Clauvel, J. P., Danon, F., Klein, M., & Seligmann, M. (1974). Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *The American journal of medicine*, 57(5), 775–788.
8. Burnet, F.M. (1959): *The Clonal Selection Theorie of Acquired Immunity*. Cambridge: The University Press.
9. Cacoub, P., Poynard, T., Ghillani, P., Charlotte, F., Olivi, M., Piette, J. C., & Opolon, P. (1999). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis and rheumatism*, 42(10), 2204–2212.
10. Carloni, G., Fioretti, D., Rinaldi, M., & Ponzetto, A. (2019). Heterogeneity and coexistence of oncogenic mechanisms involved in HCV-associated B-cell lymphomas. *Critical reviews in oncology/hematology*, 138, 156–171.

11. Chilaka, V. N., & Konje, J. C. (2021). Viral Hepatitis in pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 256, 287–296.
12. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4902), 359–362.
13. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology*, 8(5), 463–470.
14. Curry, M. P., Golden-Mason, L., Doherty, D. G., Deignan, T., Norris, S., Duffy, M., Nolan, N., Hall, W., Hegarty, J. E., & O'Farrelly, C. (2003). Expansion of innate CD5^{pos} B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver. *Journal of hepatology*, 38(5), 642–650.
15. Dagklis, A., Fazi, C., Scarfo, L., Apollonio, B., & Ghia, P. (2009). Monoclonal B lymphocytosis in the general population. *Leukemia & lymphoma*, 50(3), 490–492.
16. Dauphinée, M., Tovar, Z., & Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*, 31(5), 642–647.
17. Degenhardt, L., Peacock, A., Colledge, S., Leung, J., Grebely, J., Vickerman, P., Stone, J., Cunningham, E. B., Trickey, A., Dumchev, K., Lynskey, M., Griffiths, P., Mattick, R. P., Hickman, M., & Larney, S. (2017). Global prevalence of injecting drug use and sociodemographic characteristics and prevalence of HIV, HBV, and HCV in people who inject drugs: a multistage systematic review. *The Lancet. Global health*, 5(12), e1192–e1207.
18. Dezzutti, C. S., Astemborski, J., Thomas, D. L., Marshall, J. H., Cabrera, T., Purdy, M., Vlahov, D., & Garfein, R. S. (2004). Prevalence of cryoglobulinemia in hepatitis C virus (HCV) positive patients with and without human immunodeficiency virus (HIV) coinfection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 31(3), 210–214.
19. Dispenzieri, A., Katzmann, J. A., Kyle, R. A., Larson, D. R., Melton, L. J., 3rd, Colby, C. L., Therneau, T. M., Clark, R., Kumar, S. K., Bradwell, A., Fonseca, R., Jelinek, D. F., & Rajkumar, S. V. (2010). Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet (London, England)*, 375(9727), 1721–1728.
20. Erman, A., Krahn, M. D., Hansen, T., Wong, J., Bielecki, J. M., Feld, J. J., Wong, W. W. L., Grootendorst, P., & Thein, H. H. (2019). Estimation of fibrosis progression rates for chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis update. *BMJ open*, 9(11), e027491.

21. Falade-Nwulia, O., Suarez-Cuervo, C., Nelson, D. R., Fried, M. W., Segal, J. B., & Sulkowski, M. S. (2017). Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Annals of internal medicine*, 166(9), 637–648.
22. Fazi, C., Dagklis, A., Cottini, F., Scarfò, L., Bertilaccio, M. T., Finazzi, R., Memoli, M., & Ghia, P. (2010). Monoclonal B cell lymphocytosis in hepatitis C virus infected individuals. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 78 Suppl 1, S61–S68.
23. Forghieri, F., Luppi, M., Barozzi, P., Maffei, R., Potenza, L., Narni, F., & Marasca, R. (2012). Pathogenetic mechanisms of hepatitis C virus-induced B-cell lymphomagenesis. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 807351.
24. Freeman, A. J., Law, M. G., Kaldor, J. M., & Dore, G. J. (2003). Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis*, 10(4), 285–293.
25. Giannelli, F., Moscarella, S., Giannini, C., Caini, P., Monti, M., Gagnani, L., Romanelli, R. G., Solazzo, V., Laffi, G., La Villa, G., Gentilini, P., & Zignego, A. L. (2003). Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. *Blood*, 102(4), 1196–1201.
26. Gobran, S. T., Ancuta, P., & Shoukry, N. H. (2021). A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection. *Frontiers in immunology*, 12, 726419.
27. Goldin, L. R., McMaster, M. L., & Caporaso, N. E. (2013). Precursors to lymphoproliferative malignancies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 22(4), 533–539.
28. Greenberg, A. J., Lee, A. M., Serie, D. J., McDonnell, S. K., Cerhan, J. R., Liebow, M., Larson, D. R., Colby, C. L., Norman, A. D., Kyle, R. A., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Diasio, R. B., Slager, S. L., & Vachon, C. M. (2013). Single-nucleotide polymorphism rs1052501 associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Leukemia*, 27(2), 515–516.
29. Guntipalli, P., Pakala, R., Kumari Gara, S., Ahmed, F., Bhatnagar, A., Endaya Coronel, M. K., Razzack, A. A., Solimando, A. G., Thompson, A., Andrews, K., Enebong Nya, G., Ahmad, S., Ranaldo, R., Cozzolongo, R., & Shahini, E. (2021). Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 84(4), 637–656.
30. Hamazaki, K., Baba, M., Hasegawa, H., Kai, M., Araki, M., Watanabe, N., Tuneya, Y., Kumazawa, M., & Adachi, Y. (2003). Chronic hepatitis C

- associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 18(4), 459–460.
31. Hammer, S. M., Eron, J. J., Jr, Reiss, P., Schooley, R. T., Thompson, M. A., Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M. A., Gatell, J. M., Hirsch, M. S., Jacobsen, D. M., Montaner, J. S., Richman, D. D., Yeni, P. G., Volberding, P. A., & International AIDS Society-USA (2008). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*, 300(5), 555–570.
 32. Hartridge-Lambert, S. K., Stein, E. M., Markowitz, A. J., & Portlock, C. S. (2012). Hepatitis C and non-Hodgkin lymphoma: the clinical perspective. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(2), 634–641.
 33. Hayes, C. N., Imamura, M., Tanaka, J., & Chayama, K. (2022). Road to elimination of HCV: Clinical challenges in HCV management. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 42(9), 1935–1944.
 34. Himmelsbach, K., Mueller, S., Kress, J., Fiedler, S. A., Miskey, C., Ivics, Z., Patek, A., & Chudy, M. (2023). Second hepatitis C virus transmission by blood components since introduction of mandatory NAT screening in Germany. *Transfusion*, 63(2), 339–347.
 35. Idilman, R., Colantoni, A., De Maria, N., Alkan, S., Nand, S., & Van Thiel, D. H. (2004). Lymphoproliferative disorders in chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*, 11(4), 302–309.
 36. Jenner E. (2014). Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 427, 15–20.
 37. Katzmann, J. A., Clark, R. J., Abraham, R. S., Bryant, S., Lymp, J. F., Bradwell, A. R., & Kyle, R. A. (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clinical chemistry*, 48(9), 1437–1444.
 38. Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., & Hiepe, F. (2019). The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Frontiers in immunology*, 10, 721.
 39. Kyle, R. A., Dispenzieri, A., Kumar, S., Larson, D., Therneau, T., & Rajkumar, S. V. (2011). IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering Waldenström's macroglobulinemia (SWM). *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 11(1), 74–76.
 40. Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R., & Rajkumar, S. V. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance

- (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22), 5412–5417.
41. Lauer, G. M., & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 345(1), 41–52.
 42. Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J. O., & Bartenschlager, R. (2000). Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Journal of viral hepatitis*, 7(3), 167–174.
 43. Mageed, R. A., Garaud, S., Taher, T. E., Parikh, K., Pers, J. O., Jamin, C., Renaudineau, Y., & Youinou, P. (2012). CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte. *Autoimmunity reviews*, 11(11), 795–798.
 44. Marcucci, F., & Mele, A. (2011). Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood*, 117(6), 1792–1798.
 45. Marti, G., Abbasi, F., Raveche, E., Rawstron, A. C., Ghia, P., Aurran, T., Caporaso, N., Shim, Y. K., & Vogt, R. F. (2007). Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *British journal of haematology*, 139(5), 701–708.
 46. Matthews, G. V., & Dore, G. J. (2008). HIV and hepatitis C coinfection. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(7 Pt 1), 1000–1008.
 47. Mazzaro, C., Mauro, E., Ermacora, A., Doretto, P., Fumagalli, S., Tonizzo, M., Toffolutti, F., & Gattei, V. (2021). Hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis. *Minerva medica*, 112(2), 175–187.
 48. Melchers F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nature reviews. Immunology*, 5(7), 578–584.
 49. Melchers, F., ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X. C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A. G., & Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunological reviews*, 175, 33–46.
 50. Mele, A., Pulsoni, A., Bianco, E., Musto, P., Szklo, A., Sanpaolo, M. G., Iannitto, E., De Renzo, A., Martino, B., Liso, V., Andrizzi, C., Pusterla, S., Dore, F., Maresca, M., Merli, M., Carli, G., Arcaini, L., & Visco, C. (2016). Antiviral therapy of hepatitis C as curative treatment of indolent B-cell lymphoma. *World journal of gastroenterology*, 22(38), 8447–8458.
 51. Merli, M., Carli, G., Arcaini, L., & Visco, C. (2016). Antiviral therapy of hepatitis C as curative treatment of indolent B-cell lymphoma. *World journal of gastroenterology*, 22(38), 8447–8458.

52. Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(1), 77–87.
53. Mihăilă R. G. (2016). Hepatitis C virus - associated B cell non-Hodgkin's lymphoma. *World journal of gastroenterology*, 22(27), 6214–6223.
54. Milazzo, L., van den Bogaart, L., Sollima, S., Oreni, L., Lai, A., Morena, V., Bonazzetti, C., Ridolfo Anna, L., & Antinori, S. (2020). Impact of HCV eradication with direct-acting antiviral agents on serum gamma globulin levels in HCV and HCV/HIV coinfecting patients. *European journal of internal medicine*, 75, 50–54.
55. Mishra, S., Taneja, S., De, A., Verma, N., Premkumar, M., Naidu, G. S. R. S. N. K., Sharma, A., Duseja, A., Dhiman, R. K., & Singh, V. (2023). Efficacy, Tolerability, and Compliance of Direct Acting Antivirals in Patients with HIV and Hepatitis C Coinfection: A Real-Life Experience. *AIDS research and human retroviruses*, 10.1089/AID.2022.0034. *Advance online publication*.
56. Mizorogi, F., Hiramoto, J., Nozato, A., Takekuma, Y., Nagayama, K., Tanaka, T., & Takagi, K. (2000). Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 39(2), 112–117.
57. Monteverde, A., Ballarè, M., & Pileri, S. (1997). Hepatic lymphoid aggregates in chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia. *Springer seminars in immunopathology*, 19(1), 99–110.
58. Murphy K. Weaver C. Berg L. Barton G. & Janeway C. A. (2022). *Janeway's immunobiology* (10th ed.). W.W. Norton and Company.
59. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews. Immunology*, 15(3), 160–171.
60. Oliveira, I. S., Cabral, M. S., Jesus, L. S., Paraná, R., Atta, A. M., & Sousa Atta, M. L. (2014). Serum levels of immunoglobulin free light chains in patients with chronic hepatitis C presenting cryoglobulinemia. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 18(6), 638–642.
61. Padlan E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*, 31(3), 169–217.
62. Parikh, N. D., Mehta, N., Hoteit, M. A., Yang, J. D., John, B.V., Moon, A. M., Salgia, R. J., Pillai, A., Kassab, I., Saeed, N., Thyssen, E., Nathani, P., McKinney, J., Chan, W., Durkin, C., Connor, M., Alsudaney, M., Konjeti, R., Durand, B., Nissen, N. N., Kim, H. P., Paknikar, R., Rich, N.E., Schipper, M.J.,

- Singal, A. G. (2022). Association between sustained virological response and clinical outcomes in patients with hepatitis C infection and hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 128(19), 3470–3478.
63. PetruzzIELlo, A., Loquercio, G., Sabatino, R., Balaban, D. V., Ullah Khan, N., Piccirillo, M., Rodrigo, L., di Capua, L., Guzzo, A., Labonia, F., & Botti, G. (2019). Prevalence of Hepatitis C virus genotypes in nine selected European countries: A systematic review. *Journal of clinical laboratory analysis*, 33(5), e22876.
64. Peveling-Oberhag, J., Arcaini, L., Hansmann, M. L., & Zeuzem, S. (2013). Hepatitis C-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas. Epidemiology, molecular signature and clinical management. *Journal of hepatology*, 59(1), 169–177.
65. Pietrogrande, M., Corona, M., Milani, S., Rosti, A., Ramella, M., & Tordato, G. (1995). Relationship between rheumatoid factor and the immune response against hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinemia. *Clinical and experimental rheumatology*, 13 Suppl 13, S109–S113.
66. Rajewsky K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585), 751–758.
67. Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Melton, L. J., 3rd, Bradwell, A. R., Clark, R. J., Larson, D. R., Plevak, M. F., Dispenzieri, A., & Katzmann, J. A. (2005). Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 106(3), 812–817.
68. Rawstron A. C. (2013). Monoclonal B cell lymphocytosis--what does it really mean? *Current hematologic malignancy reports*, 8(1), 52–59.
69. Razavi-Amoli, S. K., & Alipour, A. (2022). Hepatitis C Virus Coinfection in People With Human Immunodeficiency Virus in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open forum infectious diseases*, 9(10), ofac477.
70. Roche, B., Coilly, A., Duclos-Vallee, J. C., & Samuel, D. (2018). The impact of treatment of hepatitis C with DAAs on the occurrence of HCC. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 38 Suppl 1, 139–145.
71. Rolink, A., Karasuyama, H., Grawunder, U., Haasner, D., Kudo, A., & Melchers, F. (1993). B cell development in mice with a defective lambda 5 gene. *European journal of immunology*, 23(6), 1284–1288.
72. Salmon-Ceron, D., Nahon, P., Layese, R., Bourcier, V., Sogni, P., Bani-Sadr, F., Audureau, E., Merchadou, L., Dabis, F., Wittkop, L., Roudot-Thoraval, F., & ANRS CO12 CirVir and ANRS CO13 HEPAVIH study groups (2019). Human

- Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus (HCV) Co-infected Patients With Cirrhosis Are No Longer at Higher Risk for Hepatocellular Carcinoma or End-Stage Liver Disease as Compared to HCV Mono-infected Patients. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 70(3), 939–954.
73. Sampalo, A., López-Gómez, M., Jiménez-Alonso, J., Ortiz, F., Samaniego, F., & Garrido, F. (1993). CD5+ B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease. *Clinical immunology and immunopathology*, 66(3), 260–268.
74. Sánchez Ruiz, A. C., Yebra Bango, M., Portero, F., Provencio Pulla, M., Miralles Flores, C., & España Saz, P. (2001). Prevalencia de infección por el virus de la hepatitis C en pacientes con linfomas no hodgkinianos [Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma]. *Medicina clinica*, 116(9), 333–334.
75. Sarrazin, C., Zimmermann, T., Berg, T., Neumann, U. P., Schirmacher, P., Schmidt, H., Spengler, U., Timm, J., Wedemeyer, H., Wirth, S., Zeuzem, S., (2018). S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“ [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-C-virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection - AWMF-Register-No.: 021/012]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 56(7), 756–838.
76. Schiavinato, A., Zanetto, A., Pantano, G., Tosato, F., Nabergoj, M., Fogar, P., Piva, E., Gambato, M., Franceschet, E., Floreani, A., Farinati, F., Burra, P., Russo, F. P., & Plebani, M. (2017). Polyclonal and monoclonal B lymphocytes response in HCV-infected patients treated with direct-acting antiviral agents. *Journal of viral hepatitis*, 24(12), 1168–1176.
77. Shanafelt, T. D., Ghia, P., Lanasa, M. C., Landgren, O., & Rawstron, A. C. (2010). Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*, 24(3), 512–520.
78. Shim, Y. K., Middleton, D. C., Caporaso, N. E., Rachel, J. M., Landgren, O., Abbasi, F., Raveche, E. S., Rawstron, A. C., Orfao, A., Marti, G. E., & Vogt, R. F. (2010). Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 78 Suppl 1(Suppl 1), S10–S18.
79. Shim, Y. K., Silver, S. R., Caporaso, N. E., Marti, G. E., Middleton, D. C., Linet, M. S., & Vogt, R. F. (2007). B cells behaving badly. *British journal of haematology*, 139(5), 658–662.
80. Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(1), 11–30.
81. Sikavi, C., Najarian, L., & Saab, S. (2018). Similar Sustained Virologic Response in Real-World and Clinical Trial Studies of Hepatitis C/Human

- Immunodeficiency Virus Coinfection. *Digestive diseases and sciences*, 63(11), 2829–2839.
82. Simon, K. G., Serfert, Y., Buggisch, P., Mauss, S., Boeker, K. H. W., Klinker, H., Müller, T., Merle, U., Hüppe, D., Manns, M. P., & Wedemeyer, H. (2021). Veränderungen der Hepatitis-C-Virus-Genotyp-1a/1b-Verteilung zwischen 2004 und 2018 in Deutschland – eine Analyse von 17093 Patienten aus verschiedenen Real-World-Registern [Evolution of hepatitis C virus genotype 1a vs. 1b distribution in Germany between 2004 and 2018 - An analysis of 17093 patients from different real world registries]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(3), 241–249.
 83. Sinclair, D., Dagg, J. H., Smith, J. G., & Stott, D. I. (1986). The incidence and possible relevance of Bence-Jones protein in the sera of patients with multiple myeloma. *British journal of haematology*, 62(4), 689–694.
 84. Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(1), 318–327.
 85. Talmage, D.W. (1959): Immunological specificity, unique combinations of selected natural globulins provide an alternative to the classical concept. *Science*, 129, 1643-1648.
 86. Tawfik, N. M., El Deeb, M., & Nasr, A. S. (2013). Monoclonal gammopathy among patients with chronic hepatitis C virus infection. *The American journal of the medical sciences*, 345(5), 366–368.
 87. Terrier, B., & Cacoub, P. (2013). Cryoglobulinemia vasculitis: an update. *Current opinion in rheumatology*, 25(1), 10–18.
 88. Terrier, B., Joly, F., Vazquez, T., Benech, P., Rosenzweig, M., Carpentier, W., Garrido, M., Ghillani-Dalbin, P., Klatzmann, D., Cacoub, P., & Saadoun, D. (2011). Expansion of functionally anergic CD21-/low marginal zone-like B cell clones in hepatitis C virus infection-related autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(12), 6550–6563.
 89. Terrier, B., Sène, D., Saadoun, D., Ghillani-Dalbin, P., Thibault, V., Delluc, A., Piette, J. C., & Cacoub, P. (2009). Serum-free light chain assessment in hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(1), 89–93.
 90. Thein, H. H., Yi, Q., Dore, G. J., & Krahn, M. D. (2008). Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(2), 418–431.
 91. Thomson, E. C., Fleming, V. M., Main, J., Klenerman, P., Weber, J., Eliahoo, J., Smith, J., McClure, M. O., & Karayiannis, P. (2011). Predicting spontaneous

- clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1-infected men. *Gut*, 60(6), 837–845.
92. Trejo, O., Ramos-Casals, M., García-Carrasco, M., Yagüe, J., Jiménez, S., de la Red, G., Cervera, R., Font, J., & Ingelmo, M. (2001). Cryoglobulinemia: study of etiologic factors and clinical and immunologic features in 443 patients from a single center. *Medicine*, 80(4), 252–262.
 93. Tsuji, R. F., Geba, G. P., Wang, Y., Kawamoto, K., Matis, L. A., & Askenase, P. W. (1997). Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity, and late T cell interferon gamma: a possible initiating role of B cells. *The Journal of experimental medicine*, 186(7), 1015–1026.
 94. Vallat, L., Benhamou, Y., Gutierrez, M., Ghillani, P., Hercher, C., Thibault, V., Charlotte, F., Piette, J. C., Poynard, T., Merle-Béral, H., Davi, F., & Cacoub, P. (2004). Clonal B cell populations in the blood and liver of patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arthritis and rheumatism*, 50(11), 3668–3678.
 95. van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., van Krieken, J. H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., Kneba, M. Macintyre, E. A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17(12), 2257–2317.
 96. Visentini, M., Del Padre, M., Colantuono, S., Yang, B., Minafò, Y. A., Antonini, S., Carnovale, M., De Santis, A., Pulsoni, A., De Sanctis, G. M., Gragnani, L., Zignego, A. L., Fiorilli, M., & Casato, M. (2019). Long-lasting persistence of large B-cell clones in hepatitis C virus-cured patients with complete response of mixed cryoglobulinaemia vasculitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 39(4), 628–632.
 97. Wang, W., Kong, X., Zhao, G., Huang, X., Yuan, J., Li, N., Zhang, X., Luo, K., Luan, J., & Fan, X. (2022). Seroprevalence of Transfusion Transmissible Infections and Associated Risk Factors in Hospitalized Patients before Transfusion in Jinling Hospital Nanjing University: A Three-Year Retrospective Study. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(6), 710.
 98. Wedemeyer H, Dore GJ, Ward JW. Estimates on HCV disease burden worldwide - filling the gaps. *J Viral Hepat*. 2015;22 Suppl 1:1-5.
 99. Westbrook, R. H., & Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology*, 61(1 Suppl), S58–S68.

100. World Health Organization. (2021). Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: accountability for the global health sector strategies 2016–2021

7 Anhang

7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Seite 6
Abbildung 2	Seite 14
Abbildung 3	Seite 17
Abbildung 4	Seite 28
Abbildung 5	Seite 30
Abbildung 6	Seite 33
Abbildung 7	Seite 36
Abbildung 8	Seite 37
Abbildung 9	Seite 39
Abbildung 10	Seite 41
Abbildung 11	Seite 43
Abbildung 12	Seite 43
Abbildung 13	Seite 49
Abbildung 14	Seite 51
Abbildung 15	Seite 52
Abbildung 16	Seite 55
Tabelle 1	Seite 20
Tabelle 2	Seite 26
Tabelle 3	Seite 29
Tabelle 4	Seite 39
Tabelle 5	Seite 42
Tabelle 6	Seite 44
Tabelle 7	Seite 45
Tabelle 8	Seite 46
Tabelle 9	Seite 48
Tabelle 10	Seite 50

Tabelle 11 Seite 53

Tabelle 12 Seite 54

7.2 Abkürzungsverzeichnis

μ	Schwere Kette My
5λ	Ersatzleichte Kette in der B-Zell Reifung
BCR	B-Zell Rezeptor
bright	ausgeprägt
CD	Cluster of differentiation
C_{H1-4}	Konstante Region der schweren Kette
C_L	Konstante Region der leichten Kette
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CMIA	Chemiluminiszierendes Mikropartikel-Immunassay
DAA	Direkt antiviral wirkende Agenzien
D_H	Diversity Gensegment der schweren Kette
Dim	reduziert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Engl.: <i>enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
Fc	Kristallisierendes Fragment
FLC	Freie Leichtkette
FUP	Engl.: <i>follow-up</i>
FR1-FR3	Strukturregionen der variablen Region V_H
H	Schwerkette
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus

HIV	Humanes Immundefizienz Virus
i.v.	intravenös
IF	Immunfixation
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin mit der schweren Kette Alpha
IgD	Immunglobulin mit der schweren Kette Delta
IgE	Immunglobulin mit der schweren Kette Epsilon
IgG	Immunglobulin mit der schweren Kette Gamma
IgH	Schwerketten kodierender Genabschnitt
IgL	Leichtketten kodierender Genabschnitt
IgM	Immunglobulin mit der schweren Kette My
IgV	Variable Region der schweren Kette des Immunglobulins
IU	Internationale Einheit (engl.: <i>international Unit</i>)
J _H	Joining Gensegment der schweren Kette
J _L	Joining Gensegment der leichten Kette
J _K	Gensegment für die joining Region der leichten Kette Kappa
J _λ	Gensegment für die joining Region der leichten Kette Lambda
L	Leichtkette
M-Protein	Monoklonales Protein
MBL	Monoklonale B-Lymphozytose
MC	Kryoglobulinämie (engl.: <i>mixed cryoglobulinaemia</i>)
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MM	Multiples Myelom
NAT	Nukleinsäurenachweis (engl.: <i>nucleic acid test</i>)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
pBCR	Pre B-Zell Rezeptor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	pegyliert
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SPE	Serumproteinelektrophorese

T1	Zeitpunkt vor Therapiebeginn
T2	Zeitpunkt 24 Wochen nach Therapiebeginn
ULN	Oberer Grenzwert (engl.: <i>upper limit of normal</i>)
UpM	Umdrehungszahl Zentrifuge
V _H	Variable Region/Gensegment der schweren Kette
V _L	Variable Region/Gensegment der leichten Kette
V _κ	Gensegment für die variable Region der leichten Kette Kappa
V _λ	Gensegment für die joining Region der leichten Kette Lambda
VpreB	Ersatzleichte Kette in der B-Zell Reifung
WHO	World Health Organization
κ	Leichtkette κ
λ	Leichtkette λ

8 Danksagung

An dieser Stelle geht mein Dank an Prof. Dr. med. Jan Dürig und PD Dr. med. Patricia Johansson für die Annahme als Doktorandin und die Betreuung der Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Ralf Küppers, PD Dr. med. Lewin Eisele sowie Sana Mohamad und Dr. med. Conny Faure für die Einarbeitung in die Messmethoden sowie die Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ebenso bedanke ich mich bei der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie und dem Institut für Zellbiologie und Tumorforschung des Universitätsklinikums Essen für die kooperative Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir auf diesem Weg motivierend und geduldig zur Seite standen.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.