

## 1. Einleitung

### 1.1. Die besondere Rolle der intestinalen Mukosa bei der HIV-Infektion

T-Helfer-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenmolekül CD4, welches das „Human Immunodeficiency Virus“ (HIV) zum Zelleintritt benötigt. Im Verlauf der HIV-Infektion nimmt ihre Zahl kontinuierlich ab. Es können mehr als zehn Jahre vergehen, bis die Helferzellen den unteren Normwert von 435 Helferzellen pro Mikroliter Blut unterschreiten. Diese Phase der asymptomatischen HIV-Infektion wird auch als Latenzphase bezeichnet, obwohl kontinuierlich im Körper eine HIV-Replikation stattfindet (Pantaleo et al., 1991; Pantaleo et al., 1993). Ein Helferzellabfall auf unter 200 Zellen pro Mikroliter Blut ist mit einem stark erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen vergesellschaftet, deren Auftreten dann das erworbene Immundefektsyndrom AIDS (acquired immune deficiency syndrome) definiert.

Aus der Liste AIDS-definierender Erkrankungen des Center for Disease Control (CDC, 1993) zur Stadieneinteilung der HIV-Infektion betrifft ein Großteil der Indikatorkrankheiten ausschließlich oder teilweise den Gastrointestinaltrakt. In Europa und Nordamerika leiden bis zu 50% und in den Entwicklungsländern bis zu 90% der HIV-infizierten Patienten an gastrointestinalen Beschwerden mit Diarrhoe, die häufig mit Gewichtsverlust und Kachexie (Wasting-Syndrom) auftreten (Colebunders et al., 1988; Riecken et al., 1990; Ullrich et al., 1992). Diese gastrointestinalen Beschwerden können durch eine HIV-bedingte Schädigung des mukosalen Immunsystems erklärt werden (Zeitze et al., 1998).

Die mukosale Immunantwort ist entscheidend bei der Verteidigung des Körpers gegen eine Fülle potentiell pathogener Erreger, die versuchen, über den Darm in den Körper zu gelangen. Die intestinale Mukosa ist mit ca. 200 m<sup>2</sup> die größte Oberfläche des menschlichen Körpers und das größte lymphatische Organ des Körpers. Das mukosaassoziierte Immunsystem MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) des Darms gliedert sich anatomisch und funktionell in unterschiedliche Teile (Pabst, 1987; Pabst und Rosenberg, 1998; Strober, 1986). Man stellt das organisierte mukosaassoziierte lymphatische Gewebe dem diffus verteilten gegenüber (Hein, 1999; Kraehenbuhl und Neutra, 1992; Neutra et al., 1996). Das organisierte MALT umfasst die mukosaassoziierten Lymphfollikel, die lokale Ansammlungen lymphatischer Zellen zu spezifischen anatomischen Strukturen darstellen und sich in allen mukosalen Oberflächen finden lassen. Organspezifische Aggregate wie die Tonsillen (Kuper et al., 1992; Perry and Whyte, 1998), die Peyer'schen Plaques des Dünndarms und die aggregierten Follikel der Appendix (James, 1993) stellen den Zusammenschluss mehrerer Follikel dar. Zum diffus verteilten MALT

zählt man die Lymphozyten in der intestinalen Lamina propria (Lamina propria-Lymphozyten, LPL) und jene oberhalb der Basalmembran zwischen den Epithelzellen (intraepitheliale Lymphozyten, IEL) (Hunyady et al., 2000). Ebenfalls zum diffus verteilten MALT gehören die IgA-produzierenden Plasmazellen und nicht-lymphoide Zellen wie Monozyten, Mastzellen und dendritische Zellen der Mukosa (Hein, 1999; James, 1993; MacDonald, 1999). Lamina propria T-Zellen weisen Merkmale von antigenerfahrenen Zellen auf (James, 1991; Qiao et al., 1991; Zeitz et al., 1990; Zeitz et al., 1994). 66-96% von ihnen sind CD45RO positiv, welches typisch für periphere Gedächtnis-T-Zellen mit vorausgehendem Antigenkontakt ist (Benito et al., 1997; Schieferdecker et al., 1992). Die nach Antigenkontakt im Lymphfollikel durch den Körper zirkulierenden T-Zellen wandern gezielt wieder in die Darmschleimhaut und andere mukosale Oberflächen ein, was als Homing bezeichnet wird und verteilen sich dort diffus (Hess, 1991; Jalkanen et al., 1989; Quiding-Jarbrink et al., 2001). Beim Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der SIV-Eintrittspforte bereits nach einer Woche SIV-exprimierende Zellen in der mukosalen Lamina propria nachweisbar sind, was durch das Homing der Lamina propria-Lymphozyten erklärbar ist (Kaup et al., 2001).

Wie die HIV-Infektion durch den Differenzierungsgrad der antigenerfahrenen Lamina propria-Lymphozyten beeinflusst wird (erhöhter Aktivierungsgrad), ist noch unklar. Ebenfalls unerforscht ist das Zusammenspiel von Veränderungen des Zytokinprofils und der HIV-Replikation, jedoch wird die T-Zell-Aktivierung als entscheidendes Ereignis bei der Auslösung der Virusreplikation angesehen (Embretson et al., 1993). In die Pathogenese der HIV-Erkrankung sind auch die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 involviert, welche als Korezeptoren für HIV beim Eintritt in die T-Zellen und Makrophagen fungieren (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). Die aktivierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen des diffusen MALT sind besonders geeignete Ziele für HIV, da ein höherer Anteil dieser mukosalen CD4<sup>+</sup>T-Zellen CCR5 exprimieren und die Rezeptordichte auf diesen Zellen höher ist als auf CD4<sup>+</sup>T-Zellen im peripheren Blut (Anton et al., 2000; Lapenta et al., 1999; Veazey et al., 2001). In mehreren Untersuchungen zeigte die intestinale Mukosa des Darms auch eine deutlich höhere Virusbeladung im Vergleich zum peripheren Blut (Kotler et al., 1991; Pantaleo et al., 1991; Smith et al., 1994). Die hohe Virusbeladung führt auch bei den Zielzellen zu deutlichen Veränderungen und so ist der Abfall der CD4<sup>+</sup>T-Zellen in der intestinalen Mukosa im Vergleich zum peripheren Blut viel ausgeprägter (Clayton et al., 1997; Lim et al., 1993; Pantaleo et al., 1993; Schneider et al., 1995). Bei Rhesusaffen finden sich als Folge der frühen massiven SIV-Replikation zwei Wochen nach Infektion in der intestinalen Mukosa fast keine CD4<sup>+</sup>T-Zellen mehr (Kewenig et al., 1999). Bei Patienten zeigte sich vier beziehungsweise sechs Wochen nach

einer HIV-Infektion ein ausgeprägter Verlust der mukosalen CD4<sup>+</sup>T-Zellen, wohingegen sich im Blut noch keine entsprechenden Veränderungen fanden (Guadalupe et al., 2003).

Aus den bisherigen Untersuchungsergebnissen ist zu schließen, dass die intestinale Mukosa ein wesentlicher Ort im Organismus für die HIV-Replikation ist (Schneider et al., 1997) und dass die intestinale Schleimhaut als ein bedeutendes Reservoir für HIV anzusehen ist (Fackler et al., 1998). Die Rezeptor-/Korezeptorverteilung und die erhöhte Aktivierung der Lamina propria Lymphozyten bieten nur teilweise Erklärungen für die genannten Veränderungen in der intestinalen Mukosa bei der HIV-Infektion. Eine wesentliche Rolle für den spezifischen Verlauf der HIV-Infektion in diesem Kompartiment kann in einer veränderten Zytokinexpression in der intestinalen Mukosa vermutet werden.

Die hochdifferenzierten Lamina propria T-Zellen modulieren in erster Linie durch die Synthese von Zytokinen die lokale Immunantwort (Zeititz et al., 1988). Nach dem Muster der Zytokinsekretion erfolgt die Unterteilung der CD4<sup>+</sup>T-Zellen in T-Helfer1- und T-Helfer2-Lymphozyten. T-Helfer1-Zellen produzieren hauptsächlich Zytokine, die die zelluläre Immunreaktion unterstützen, wie IL-2 und IFN- $\gamma$ . T-Helfer2-Lymphozyten sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10, welche die humorale Immunantwort regulieren und im wesentlichen B-Lymphozyten zur Aktivierung und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen stimulieren.

## **1.2. Zytokine**

Zytokine dienen als Botenstoffe der interzellulären Kommunikation. Der Begriff Zytokine umfasst eine uneinheitliche Gruppe löslicher Peptide und Proteine mit kurzer Halbwertszeit, die als humorale Regulatoren in nano- bis picomolaren Konzentrationen die Aktivitäten einzelner Zellen und Gewebe modulieren. Charakteristisch ist die parakrine (auf die Zellen der unmittelbaren Umgebung zielende) und/oder autokrine (auf die zytokinproduzierende Zelle selbst zielende) Wirkung neben den systemischen Effekten im Sinne klassischer endokriner Hormone. Indem sie an spezifische, hochaffine Rezeptoren binden, lösen sie einzelne oder ganze Kaskaden von zellspezifischen Aktionen aus und koordinieren so die Aktivitäten der Zielzellen. Zu diesen Aktivitäten zählen die Induktion sowie die Inhibition von weiteren Zytokinausschüttungen, so dass in vivo selten einem Zytokin eine bestimmte Wirkung zuzuschreiben ist, und man vielmehr die Zellaktivitäten unter dem Einfluss eines Zytokinnetzwerkes verstehen muss. Die Einteilung der Zytokine in Interleukine, Chemokine und Interferone ist historisch zu sehen und ist teilweise eher irreführend als hilfreich. Die mukosale

Zytokinproduktion hat entscheidende Bedeutung für die Regulation der Effektorelemente des Immunsystems und beeinflusst, zumindest in vitro, die Replikation von HIV (Cocchi et al., 1995).

In dieser Arbeit sollen die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-6, die immunregulatorischen Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 und die in vitro HIV-regulatorisch wirkenden Zytokine IL-16, CCL3 und CCL5 untersucht werden. Im Folgenden werden die grundlegenden Merkmale und Wirkungen dieser Zytokine aufgeführt. Als Grundlage diente das Lehrbuch „Immunology“ (Roitt, 2001) sowie COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia von Horst Ibelgaufits (Ibelgaufits, 2005) mit ausführlichen Verweisen auf die Originalliteratur.

**IL-2:** IL-2 wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>T-Zellen und in geringen Mengen auch von CD8<sup>+</sup>T-Zellen produziert und ist der bedeutendste Faktor für T-Zellwachstum und T-Zellaktivierung mit Wirkung auf fast alle Typen von T-Zellen. In abgeschwächter Form kann IL-2 auch bei einigen B-Zellen Zellwachstum und Zelldifferenzierung induzieren.

**IL-4:** IL-4 führt zur Steigerung der MHC-Klasse-II-Expression auf Makrophagen, zur Steigerung der Antigenpräsentation und zur Stimulation der IgG- und IgE-Produktion durch B-Zellen. IL-4 wirkt als autokriner Wachstumsfaktor für antigenspezifische T-Zellen und führt zur Steigerung des T-Zell-Wachstums. Hervorzuheben ist der antagonistische Effekt zu IFN- $\gamma$ .

**IL-6:** IL-6 wird von aktivierten lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen Fibroblasten, Endothelzellen und einigen Tumorzellen gebildet und spielt eine zentrale Rolle bei der immunologischen Abwehr. T-Zellen können nur in Anwesenheit von Monozyten IL-6 produzieren. Monozyten und T-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Schnelligkeit ihrer IL-6-Antwort. Die IL-6-mRNA-Expression in Monozyten erreicht bereits nach fünf Stunden, in T-Zellen dagegen erst nach 24 bis 48 Stunden ihr Maximum. Diese Befunde weisen darauf hin, dass das von Monozyten und T-Zellen produzierte IL-6 auf verschiedene Phasen der Immunantwort wirkt. IL-6 wird im Verlauf der Entzündungsreaktion gebildet und beeinflusst Wachstum und Differenzierung von B- und T-Zellen. In B-Zellen induziert IL-6 die Reifung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und fördert dort die Produktion der Immunglobuline IgM, IgG und IgA. In vielen Fällen wirkt IL-6 gemeinsam mit anderen Zytokinen. So bewirken IL-6 und IL-1 die Proliferation, Zytokinproduktion und IL-2-Rezeptor-Expression bei T-Helferzellen, IL-6 zusammen mit IL-2

die Teilung und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen. Weiterhin steigert IL-6 die Phagozytosefähigkeit und Fc-Rezeptor-Expression bei mononukleären Phagozyten.

**IL-10:** IL-10 fördert die Reifung von T-Helfer2-Zellen und unterdrückt die von T-Helfer1-Zellen. Es steigert die humorale Immunantwort und unterdrückt die zelluläre Immunantwort. Es supprimiert jedoch nicht nur die Proliferation der T-Helfer1-Zellen, sondern inhibiert vor allem deren Zytokinproduktion.

**IL-16:** IL-16 hat chemotaktische Wirkung und bewirkt die Migration von CD4<sup>+</sup>T-Zellen, Monozyten und eosinophilen Granulozyten. Es induziert in T-Lymphozyten die Expression von IL-2-Rezeptoren. IL-16 bindet an den CD4-Rezeptor der T-Zellen. Es wurde gezeigt, dass IL-16 die Replikation von HIV und SIV (Baier and Kurth, 1997; Baier et al., 1995) supprimieren kann.

**TNF- $\alpha$ :** TNF- $\alpha$  wird von aktivierten T-Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet. Die Bedeutung von TNF- $\alpha$  innerhalb des Immunsystems ist weniger in der antitumoralen Wirkung als in seiner zentralen regulatorischen Rolle bei Entzündungs- und Immunreaktionen zu sehen. Seine wichtigste Aufgabe ist die Induktion weiterer Zytokine. Er beeinflusst zusammen mit IL-1 T- und B-Lymphozyten und unterstützt die Aktivierung von antigenstimulierten T-Zellen und die Antikörperproduktion. Unstimulierte mononukleäre Phagozyten exprimieren zwar mRNA für TNF- $\alpha$ , die Bildung des Proteins erfolgt jedoch nicht. Erst die Aktivierung der Zellen durch verschiedene Auslöser, wie Bestandteile von Bakterien, Protozoen oder Viren, Zytokine oder Phagozytose von Mikroorganismen, führt zur Freisetzung des TNF- $\alpha$ -Proteins und zur Transkription weiterer TNF- $\alpha$ -DNA.

**IFN- $\gamma$ :** IFN- $\gamma$  wird von aktivierten CD4<sup>+</sup>T- und CD8<sup>+</sup>T-Zellen und natürlichen Killerzellen sezerniert. Seine Ausschüttung bewirkt eine Verbesserung der Antigenpräsentation. Diese Wirkung beruht auf einer Induktion der Expression von MHC-Molekülen der Klasse II auf antigenpräsentierenden Zellen. Es ist der stärkste Stimulus für eine allgemeine Aktivierung von Makrophagen und steigert deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Auf Kostimulation durch IFN- $\gamma$  und IL-2 von CD4<sup>+</sup>T-Zellen reagieren CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität gegenüber virusinfizierten Zellen. Die direkte antivirale Aktivität auf virusinfizierte Zellen ist nur schwach ausgeprägt. In B-Zellen fördert es die Differenzierung und hemmt deren Proliferation.

**CCL3:** CCL3, früher als MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$ ) bezeichnet, ist ein natürlicher Ligand des CCR5 Rezeptors. Es ist in die Zellaktivierung von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten involviert und scheint eine wichtige Rolle bei der akuten neutrophilen Entzündungsreaktion einzunehmen. Hauptsächlich werden CCL3 und CCL5 bei HIV-infizierten Patienten von CD8<sup>+</sup>T-Zellen produziert, die eine HIV-supprimierende Wirkung besitzen (Cocchi et al., 1995). CCL3 induziert die Synthese weiterer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF-  $\alpha$ .

**CCL5:** CCL5, früher als RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted) bezeichnet, und CCL3 werden in die Zytokinuntergruppe der Chemokine eingeordnet. Chemokine werden klassifiziert nach der Anordnung zweier Cystein (C)-Reste innerhalb einer hochkonservierten Region nahe dem N-terminalen Ende: Bei den CXC-Chemokinen ( $\alpha$ -Chemokinen) sind die Cysteine durch eine einzige (variable) Aminosäure (X) getrennt, bei den CC-Chemokinen ( $\beta$ -Chemokinen) liegen sie direkt nebeneinander (Rollins, 1997). CCL5 wird vorrangig von aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen sezerniert. Es sind inhibitorische Effekte auf die HIV-Replikation beschrieben worden (Cocchi et al., 1995). CCL5 ist der natürliche Ligand des Zelloberflächen-Rezeptors CCR5. Der CCR5-Rezeptor stellt für HIV einen Korezeptor neben dem CD4-Rezeptor dar. Es konnte nach Blocken dieses Rezeptors eine CCR5-abhängige Inhibition der HIV-Infektion nachgewiesen werden (Cohen et al., 1997; Gong et al., 1998). Individuen mit einer Mutation im CCR5-Gen, welche sowohl eine Bindung von CCL5 als auch von HIV am Rezeptor unmöglich macht, zeigten eine normale Lebenserwartung und waren resistent gegen eine HIV-Infektion (Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Liu et al., 1996).

### 1.3. Zytokinexpression in der Mukosa während der HIV-Infektion

Die hohe HIV-Produktion in der intestinalen Mukosa ist möglicherweise durch das lokale Zytokinmilieu bedingt. In Einzelfallberichten wurde eine erhöhte mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  und eine verminderte IL-10-mRNA-Expression in der intestinalen Mukosa von HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu Kontrollen beschrieben (McGowan et al., 1994). Insgesamt existieren bisher nur wenige Untersuchungen mit geringen Patientenzahlen. In Sigmabiopsien von HIV-infizierten Patienten wurden keine signifikanten Veränderungen der mukosalen mRNA-Expression von T-Helfer1- zu T-Helfer2-Zytokinen festgestellt. Trotzdem wurden die Daten dahingehend interpretiert, dass während des gesamten Krankheitsverlaufs ein progressiver Anstieg der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine festzustellen sei (Reka et al., 1994). Insbesondere ist unklar, ob die erhöhte Zytokinproduktion Ursache oder Folge der erhöhten HIV-Produktion ist.

Seit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1996 zur Behandlung HIV-infizierter Patienten veränderte sich der Krankheitsverlauf der HIV-Infektion außerordentlich. Nach 1996 war eine Virussuppression im Plasma bis unter die Nachweisgrenze möglich, und es wurde ein relevanter Anstieg von CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Blut beobachtet. Diese Veränderungen wurden zum Maßstab für die Beurteilung einer HAART (Gulick et al., 1997; Lederman et al., 1998). Mit dem Abfall der Viruslast und dem Anstieg der Helferzellzahl im peripheren Blut kommt es zu einer Immunrestitution bei den behandelten Patienten, so dass in industrialisierten Ländern in den Folgejahren eine reduzierte Mortalität und Morbidität bei HIV-Patienten zu verzeichnen war (Cameron et al., 1998; Palella et al., 1998).

Die Effektivität einer HAART wird anhand der Anzahl der T-Lymphozyten im peripheren Blut bestimmt, was durch die unkomplizierte und für den Patienten risikoarme Blutabnahme zur Lymphozytengewinnung erklärbar ist. Da der Anteil der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten lediglich 2 bis 5% der gesamten Lymphozytenpopulation repräsentiert (Pabst und Rosenberg, 1998), liegt es nahe, zum besseren Verständnis der immunologischen Veränderungen unter HAART weitere Untersuchungen im MALT, dem Hauptreservoir der T-Lymphozyten vorzunehmen. Untersuchungen am MALT im Rhesusaffenmodell zeigten nach sechsmonatiger HAART und nicht nachweisbarer Viruslast im Plasma replikationskompetente Viren in Lymphknoten aus dem Lymphabflussgebiet des Darms (Shen et al., 2003). Analog dazu gibt es zwar Daten zur Zytokinproduktion unter HAART im peripheren Blut, die eine Immunrestitution suggerieren (Amirayan-Chevillard et al., 2000; Sousa et al., 2000;

Stylianou et al., 2000). Die Zytokin-mRNA-Expression in der intestinalen Mukosa wurde dagegen bisher wenig untersucht und ist nur unzureichend charakterisiert.

#### **1.4. Zielsetzung**

Die intestinale Mukosa ist für die Pathogenese der HIV-Infektion von besonderer Bedeutung. Hier findet eine hohe HIV-Replikation und ein schneller CD4<sup>+</sup>T-Zellverlust statt. Die Ursachen hierfür sind bisher unbekannt. Lokale Zytokine können hierbei eine besondere Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit war daher a) die Bestimmung der Expression der mukosalen Zytokine, die für die HIV-Replikation von Bedeutung sind und b) die Erfassung von Veränderungen der Zytokinexpression unter HAART. Hierzu musste zunächst eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, aus den geringen Mengen Untersuchungsmaterials Zytokin-Expressionsmuster zu analysieren.