

## **1. Einleitung**

### **1.1 HIV-Infektion: Klinik und Pathophysiologie**

#### 1.1.1 Pathophysiologie

Erreger der HIV-Infektion ist das Human Immunodeficiency Virus, ein Virus aus der Gruppe der Retroviren. Die Retroviren werden in sieben Untergruppen unterteilt. Das HI-Virus wird zu der Untergruppe der Lentiviren gezählt (Francki et al. (1991)). Von dem HI-Virus sind 2 Typen bekannt: HIV-1 und HIV-2. In Europa ist fast ausschließlich HIV-1 verbreitet. Von HIV-1 sind 9 verschiedene Virusstämme bekannt (A,B,C,D,E,F,G,H und O).

Eintrittspforten der HIV-Infektion sind die Blutbahn und die Schleimhäute. Zielzellen des HIV-1 Virus sind die CD4- Rezeptor-tragenden Zellen (Klatzmann et al.(1984)). Die darauf folgenden primären Ereignisse sind im Tiermodell mit dem Simian-Immunodeficiency-Virus untersucht worden (Reimann et al. (1994), Chakrabarti et al. (1994)). Als erstes Zeichen einer Infektion zeigen sich ungefähr 7 Tage nach der Infektion virus-exprimierende Zellen in den Lymphknoten. Als Reaktion erscheinen wenig später virusspezifische zytotoxische T-Lymphozyten, woraufhin die Anzahl virus-exprimierender Zellen in den Lymphknoten stark abfällt. Parallel mit dem Anstieg und Abfall der virus-exprimierenden Zellen in den Lymphknoten können steigende bzw. fallende Titer vom P24-Antigen im Blut nachgewiesen werden. Als Zeichen der humoralen Immunantwort erscheinen jetzt Komplement-bindende Antikörper im Blut, wozu parallel die gebundene Menge Komplement-gebundener Antigen-Antikörper-Komplexe im follikulär-dendritischen Netzwerk der Keimzentren der Lymphknoten ansteigt. Neutralisierende Antikörper erscheinen erst nach circa 3 Monaten. Zu einem Zeitpunkt also, an dem das primäre Infektionsstadium in ein chronisches Infektionsstadium übergeht. Zusammenfassend verläuft die primäre HIV-Infektion über den Transport des Virus in einen Lymphknoten, der Expression und folgenden Dissemination des Virus, welche sich in hoher Virusbelastung des Blutes und HIV-Provirus-haltigen mononuklearen Zellen des Blutes ausdrückt (Tindall et al. (1991), Clark et al. (1991), Daar et al.(1991), Grazioni et al. (1993)). Diesem Peak der Virusbelastung folgt ein starker Abfall, was auf eine partiell effektive Immunantwort der humoralen und zellulären Immunantwort schließen lässt, wobei Vorläuferzellen HIV-spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten früher nachgewiesen wurden als neutralisierende Antikörper (Safrit et al. (1994)). Die primäre Immunantwort auf die HIV-

Infektion ist also in der Lage, die Virusreplikation und Verbreitung effektiv zu kontrollieren, jedoch kommt es zu keiner Viruselimination (Fauci et al. (1991)). Ursache dieser fehlenden Viruselimination könnte die fehlende Antigenexpression latent infizierter Zellen sein (Schnittmann et al. (1989), Embretson et al.(1993)). Das gefangene Virus in den Keimzentren der Lymphknoten könnte empfängliche Zellen, die den Lymphknoten passieren, infizieren (Armstrong et al. (1985), Emilie et al. (1990), Fox et al (1991), Spiegel et al (1992)).

Diskutiert wird die Frage, weshalb es zu einer Progression der chronischen HIV-Infektion in Richtung zunehmender Virusexpression in den Lymphknoten und Virusbelastung des Blutes und mangelnder Funktion des Immunsystems kommt. Als Erklärungen werden direkte, HIV-vermittelte, zytopathische Effekte (Garry et al. (1989), Sodroski et al. (1986), Lifson et al.(1986)) und ihre Wirkung in Verbindung mit Co-Infektionen von z.B. Mykoplasmen (Montagnier et al. (1993)) oder dem Herpesvirus-6 (Lusso et al. 1994) vermutet. Des Weiteren wurde die Interaktion zwischen HIV-Antigenen und dem T4-Helferzellrezeptor untersucht. Es wird vermutet das HIV-Antigene einen funktionellen Defekt der T4-Helferzellen auslösen können. (Linette et al. (1988), Amadori et al (1992)).

Ein ähnliches Konzept verfolgen Arbeiten, die die Ursache der Immunsuppression in Antikörpern, die gegen MHC Klasse II Antigene gerichtet sind, untersuchen (Golding et al. (1988),(1989)). Zudem wurde die abnormale Aktivierung der Apoptosis als Ursache der Immunsuppression untersucht (Ameisen et al. (1991), Groux et al. (1992), Laurent-Crawford et al. (1991), Terai et al. (1991), Banda et al. (1992)).

Pantaleo et al. (1995) verstehen die oben genannten Untersuchungsgegenstände als Phänomene der chronischen HIV-Infektion (Ascher et al. (1988),(1990), Pantaleo et al. (1990), (1994), Sheppard et al. (1991), Lang et al. (1988)), wobei der duale Effekt der Immunstimulation zwischen Kontrolle der chronischen Infektion und Stimulation des HI-Virus zur Virusreplikation betont wird. Als Beispiel sei hierfür die primäre Immunaktivierung angeführt, die einerseits Voraussetzung für die Bildung einer Immunantwort auf die Infektion darstellt, andererseits die Virus-Replikation und -verbreitung fördert.

Pantaleo et al. verstehen die Pathogenese der progressiven HIV-Infektion multifaktoriell in so weit die oben genannten Mechanismen in ihrer Gesamtheit zu einer chronischen entzündlichen Reaktion führen, die zu einer progressiven Zerstörung des Lymphatischen Systems, gekennzeichnet durch Verfettung und Fibrosierung der Lymphknoten führen (Pantaleo et al. (1991), (1993-1), (1993-2), (1993-3), (1995), Biberfeld et al.(1987), Armstrong et al. (1991), Tenner et

al. (1985)). Pantaleo et al. (1995) schließen hieraus, daß die chronische HIV-Infektion mit der Folge einer zellulären und humoralen Aktivierung des Immunsystems zu einer progressiven Zerstörung des lymphatischen Gewebes führt. Diese wiederum führt zu einer inadäquaten Immunreaktion, so daß allmählich eine effektive Kontrolle der Virusinfektion verloren geht.

Neben den klinischen Zeichen einer Progression der HIV-Infektion, zeigt sich mit dem Fortschreiten der HIV-Infektion eine Depletion der T<sub>4</sub>-Helferzellen (Fahley et al. (1990)), steigende Anzahl der Kopien von HIV-DNA im Blut (Dickover et al. (1994)), eine zunehmende Expression von HIV-mRNA (Boten Ribonukleinsäure) in peripheren Blutzellen (Saksela et al. (1994)), steigende Mengen von HIV-1-p24-Antigen im Blut (Mac Donell et al. (1990)), steigende Mengen von Neopterin (Melmed et al.(1989)), Immunglobulin A (Ellenberg et al. (1991), Pollis et al. (1990)) und der  $\beta_2$ -Mikroglobuline (Liffson et al. (1992)). Eine zunehmende Beachtung in der Einschätzung der Progression der HIV-Infektion haben Funktionstests der T-Zell-Funktion erfahren. Gordin et al. (1994) zeigen, daß die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion nach Hauttestung eine unabhängige prediktive Aussagekraft in der Progression des Krankheitsverlaufes gegenüber anderen Markern einnimmt. Schellekens et al. (1990) zeigen, daß die abnehmende Reaktionsbereitschaft der T-Lymphozyten nach Stimulation des CD3- T-Zellrezeptors mit dem Krankheitsverlauf korreliert.

## **1.2 Physiologie T- Zell- vermittelter Immunreaktionen**

### **1.2.1 Hämatopoese**

Wie alle hämatopoetischen Zellen stammen die Lymphozyten, phagozytäre Zellen, Erythrozyten und Thrombozyten von der pluripotenten hämatologischen Stammzelle ab (Haynet et al. (1988), Terstappen et al.(1992)). Eine weitere Differenzierung der lymphozytären Vorläuferzelle zur T- Vorläuferzelle erfolgt in der Thymusdrüse. Dort erfolgt unter dem Einfluss von Interleukin-2 und Interleukin-4 eine weitere Differenzierung und Selektion zu reifen  $\alpha\beta$ - T-Zellen und  $\gamma\delta$ - T- Zellen (Plum et al. (1990), Bärkena et al. (1991)). Eine Übersicht der Entwicklung der Differenzierung von Lymphozyten und Phagozyten aus der hämatologischen Stammzelle ist in Abb.1 dargestellt.

Abb.1

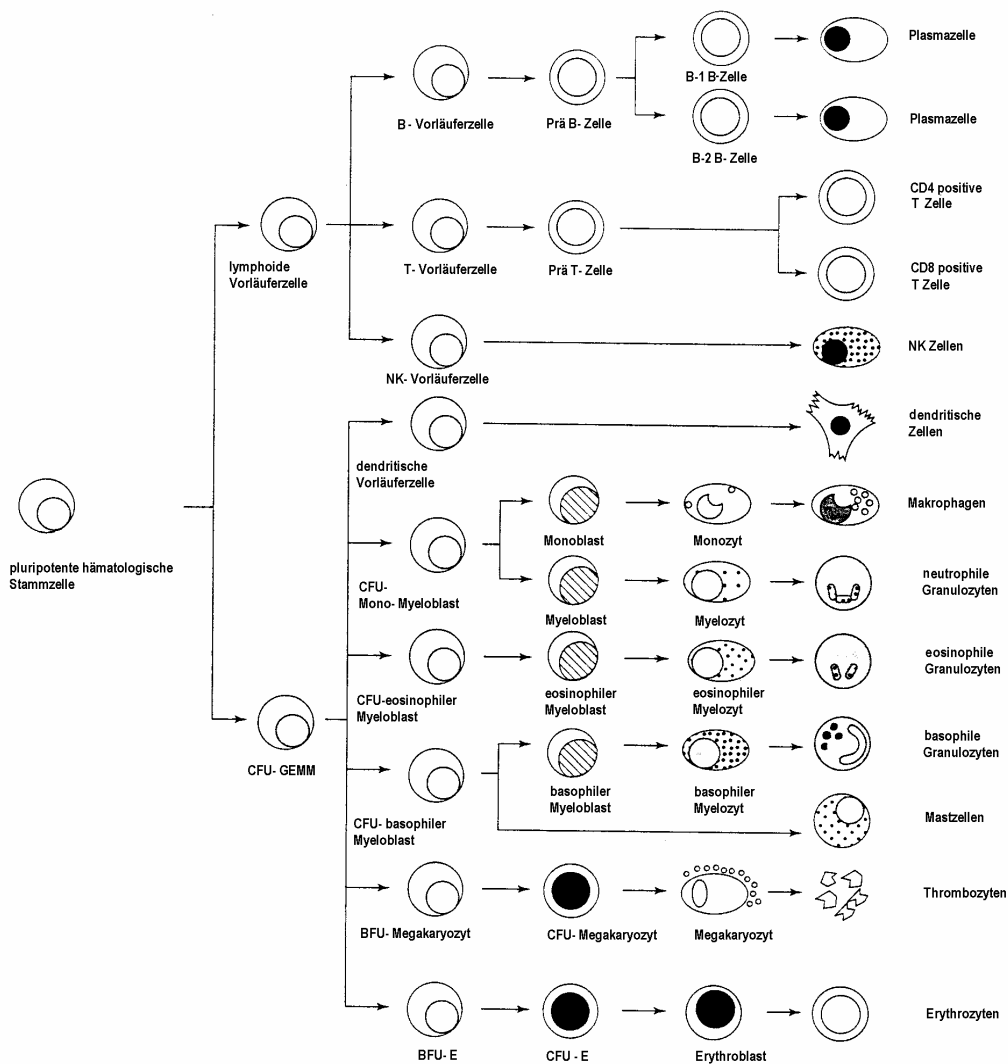


Abb.1 Übersicht über die Differenzierung von Lymphozyten und Phagozyten aus der hämatopoetischen Stammzelle.

Die Differenzierung und Geschwindigkeit der Teilung der Vorläuferzellen in den einzelnen Zelllinien wird im wesentlichen durch Zytokine gesteuert. Eine synergistische Wirkung wird erreicht, in dem die Zellbildung an mehreren Punkten der Zellentwicklung stimuliert wird. So stimuliert zum Beispiel Interleukin-1 sowohl das Wachstum der hämatopoetischen Stammzellen als auch die Zelllinie der T- Lymphozyten.

### 1.2.2 Antigenerkennung über antigenpräsentierende Zellen

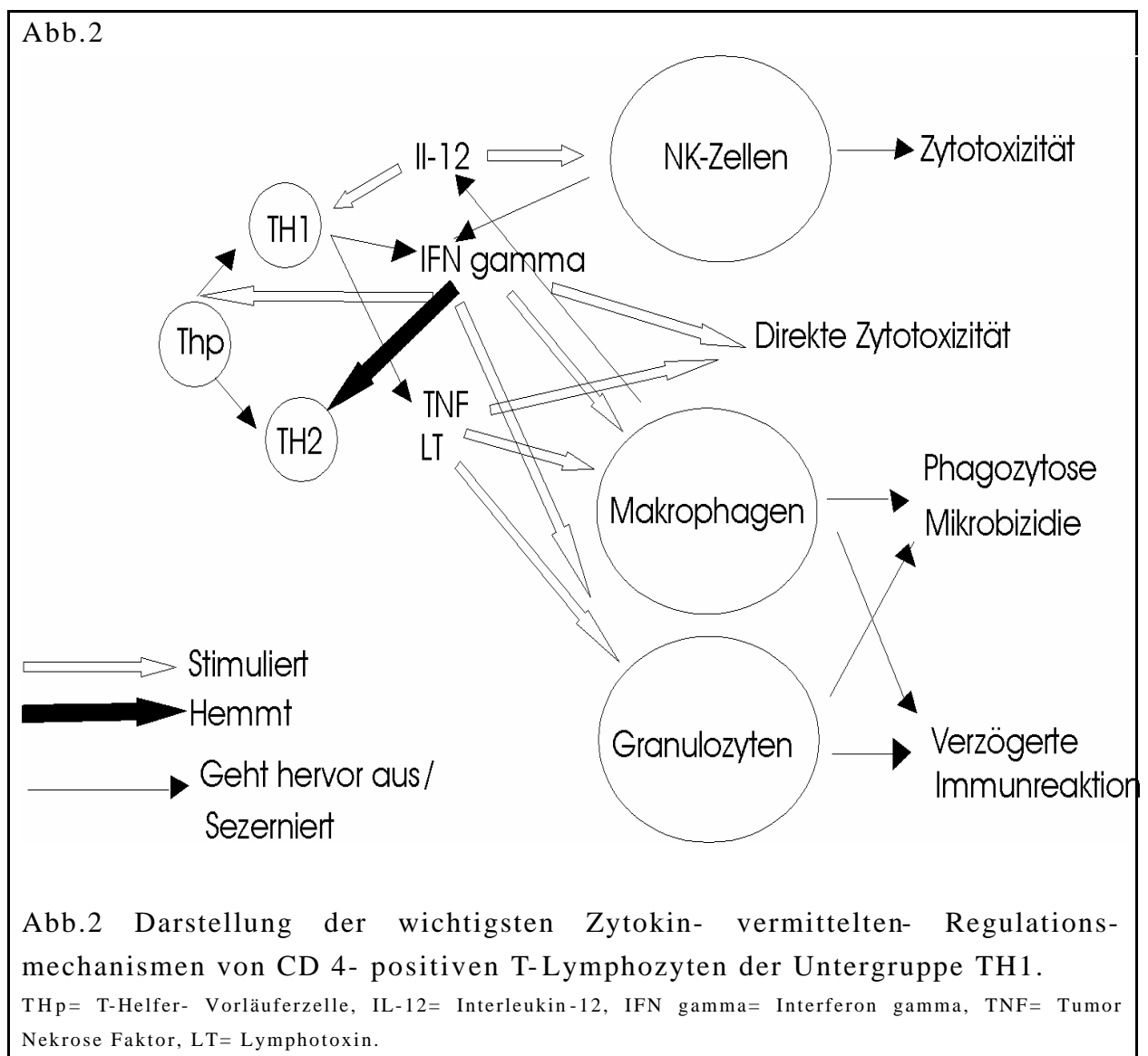
Zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, von Kupffer-Sternzellen und B-Lymphozyten. Diesen Zellen ist die Fähigkeit Antigen aufzunehmen und Antigene Strukturen zusammen mit Major-Histo-Compatibility (MHC) Molekülen an der Zelloberfläche zu exprimieren gemeinsam. Die Vorgänge der Antigenpräsentation und Vermehrung antigenspezifischer T Zellen werden im folgenden am Beispiel der Antigenpräsentation von Makrophagen dargestellt. Hierbei präsentiert der Makrophage phagozytiertes Antigen zusammen mit Major-Histo-Compatibility (MHC) Molekülen auf seiner Zelloberfläche. Man unterscheidet zwischen Klasse-1- und Klasse-2-MHC-Molekülen. Vereinfacht dargestellt, wird exogenes Material, wie zum Beispiel phagozytierte Bakterien, in endosomalen Vesikeln teilweise abgebaut und darauffolgend mit Klasse-2-MHC-Molekülen präsentiert. So kann es über T-Zell Rezeptoren von CD4-positiven T-Lymphozyten erkannt werden (Swain et al. (1983), Meuer et al. (1982), Berke et al. (1989), Damle et al. (1985), Kaufmann et al. (1988), De Libero et al. (1988)). Endogenes Material, wie zum Beispiel Virusproteine virusinfizierter Zellen, wird mit Klasse-1-MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert und kann so über T-Zell-Rezeptoren von CD8-positiven T-Lymphozyten erkannt werden (Swain et al. (1983)).

### 1.2.3 T-Zell abhängige Immunreaktion

#### 1.2.3.1 Mechanismen CD4 -positiver T-Lymphozyten in der Induktion der spezifischen Immunreaktion

Wesentliche Steuerungselemente der Immunreaktion der CD4-positiven T-Lymphozyten sind Zytokine. Je nach Entzündungsreaktion wird ein unterschiedliches Spektrum von Zytokinen, die an der Vermittlung der Entzündungsreaktion beteiligt sind, nachgewiesen. Entsprechend diesem unterschiedlichen Spektrum an Zytokinen, die von CD4-positiven T-Lymphozyten sezerniert werden, kann zwischen CD4-positiven T Lymphozyten in TH1 und TH2 Untergruppen unterschieden werden (Fowell et al. (1991). CD4- positive T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 sind bei zellvermittelten Immunreaktionen zu finden (Kaufmann et al (1993))). CD4- positive T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 sezernieren als Zytokine Interleukin-2, Interferon gamma, TNF alpha, Interleukin-3, GM-CSF. Effektorzellen dieser Zytokine unter den Antigen präsentierenden Zellen sind vorwiegend Ma-

krophagen, in geringen Umfang erfolgt auch eine Stimulation von B- Zellen. Entzündungsreaktionen CD4- positiver T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 werden vorwiegend über Monozyten vermittelt. Diese Aktivierung der Monozyten erfolgt hauptsächlich über TNF. CD4- positive T- Lymphozyten der Untergruppe TH1 vermitteln die verzögerte T-Zell Immunantwort. Sie hemmen CD4- positive T- Lymphozyten der Untergruppe TH2 über Interferon gamma und stimulieren sich autokrin über Interleukin-2 (Sher et al 1992). Insgesamt kann also Zusammengefasst werden, daß CD4- positive T- Lymphozyten der Untergruppe TH1 die hauptsächlichen Effektorzellen der zellvermittelten Immunität sind. Dabei wirken die gebildeten Zytokine im Zusammenspiel und regulieren sowohl Funktionen als auch Zytokinfreisetzung anderer Zellen. Auf diese Weise werden synergistische Effekte erreicht. Das Zusammenspiel wichtiger Zytokine in der von CD4- positiver T- Lymphozyten der Untergruppe TH1 ausgelösten Immunreaktion sind schematisch in Abb.2 dargestellt.



Wie aus Abb. 2 ersichtlich wird die zellvermittelte Immunreaktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen durch TNF, Lymphotoxin und Interferon gamma direkt stimuliert. Indirekt wird über eine vermehrte Bildung von Interleukin-12 durch Makrophagen auch die Aktivität der NK-Zellen stimuliert. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Steuerung der Immunreaktion ist die positive Rückkopplung der Generation CD4- positiver Lymphozyten der Untergruppe TH1 durch Interferon gamma, bei gleichzeitiger Hemmung der Generation CD4- positiver Lymphozyten der Untergruppe TH2 durch Interferon gamma.

CD4- positive T Lymphozyten der Untergruppe TH2 bilden die Cytokine Interleukin-4 Interleukin-5, Interleukin-10, Interleukin-13, Interleukin-3 und GM-CSF. Eine vorwiegende Stimulation antigenpräsentierender Zellen entfällt auf die B-Zellen, in geringem Umfang werden auch Makrophagen stimuliert. Entzündungsreaktionen sind vorwiegend über IgE und eosinophile Granulozyten und Mastzellen vermittelt (Sher et al. (1992)). Die mit einer Aktivierung einhergehende Sezernierung von Zytokinen bewirkt eine positive autokrine Rückkopplung über Interleukin-4. Abb.3 verdeutlicht das enge Zusammenspiel der Regulation der Immunreaktionen der TH2- und TH1- Untergruppen. Dabei wird zum einen die Reaktion von Lymphozyten der Untergruppe TH1 direkt durch Interleukin-4 und Interleukin-10 gehemmt (Bloom et al. (1992)). Darüber hinaus erfolgt über Interleukin-10 eine Hemmung der Makrophagen und NK-Zellen und über Interleukin-4 eine Hemmung der Makrophagenfunktion.

Abb.3

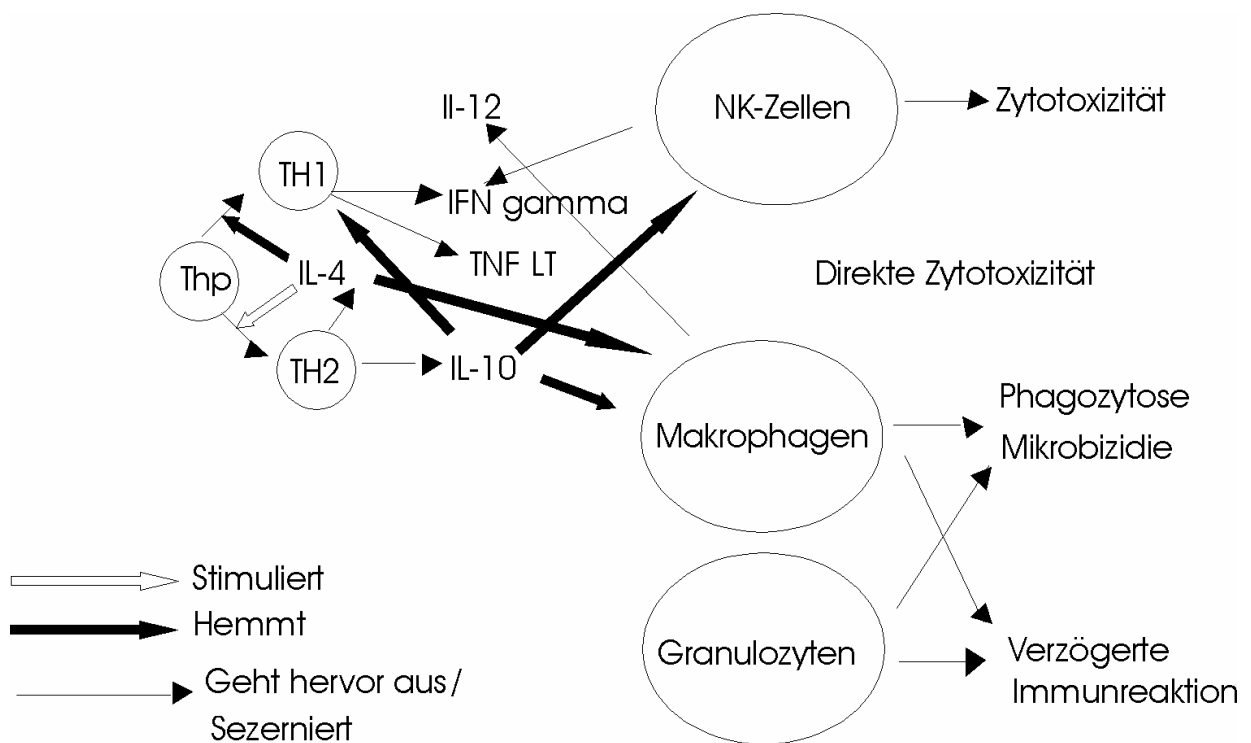


Abb.3 Einfluss der Immunreaktion CD4- positiver Lymphozyten der Untergruppe TH2 auf die zellvermittelte Immunreaktion.

THp= T-Helfer Vorläuferzelle, IL- 4= Interleukin-4, IL-10 = Interleukin-10, IL-12= Interleukin-12, IFN gamma= Interferon gamma, TNF= Tumor Nekrose Faktor, LT= Lymphotoxin.

### 1.2.3.1.1 Differenzierung CD4- positiver Lymphozyten in die Untergruppen TH1 oder TH2

Die Differenzierung CD4- positiver T- Lymphozyten zu den Untergruppen TH1 oder TH2 erfolgt aus undeterminierten CD4- positiven T- Lymphozyten der Gruppe TH0 (Street et al. (1990), Röcken et al. (1992), Kamogawa et al. (1993)). Die CD4- positiven T- Lymphozyten der Gruppe TH0 haben die Fähigkeit das gesamte Spektrum der Zytokine der Untergruppen TH1 und TH2 zu bilden. Die Differenzierung zur Untergruppe TH1 oder TH2 hängt ab von der Art der Antigen präsentierenden Zelle, wobei Makrophagen die Differenzierung der Untergruppe TH1 und B-Zellen die Differenzierung zur Untergruppe TH2 begünstigen. Außerdem werden bei großen Mengen von Antigen die Differenzierung zur Untergruppe TH2 bei kleinen Mengen von Antigen die Differenzierung zur Untergruppe TH1 begünstigt (Fitch et al. (1994), Paul et al (1994)).



Als dritter bekannter Faktor begünstigen die Zytokine die während des Differenzierungsvorgang vorherrschen eine Differenzierung zur Untergruppe TH1 oder TH2. Interleukin-12 und Interferon gamma begünstigen die Differenzierung CD4- positiver T- Lymphozyten zur Subgruppe TH1. Interleukin-4 begünstigt die Differenzierung CD4- positiver T- Lymphozyten zur Subgruppe TH2 (Seder et al. (1992), Mc Knight et al (1994)).

#### 1.2.3.2 Immunreaktion CD8- positiver T-Lymphozyten

Am besten untersucht ist der Effektormechanismus anhand dem zytotoxischen T- Lymphozyten. Dieser Zelltyp wird überwiegend, aber nicht ausschließlich, von CD8- positiven T- Lymphozyten gestellt (Martz et al 1993). Aufgabe dieser Zellen ist die direkte Vernichtung von Zielzellen wie zum Beispiel Virus- infizierte- Zellen bei einem Großteil der Virusinfekte (inklusive HIV-1 und HIV-2) oder Tumorzellen (Rosenberg et al. (1986)). Diese Vernichtung lässt sich in 4 Schritte einteilen:

1. Erkennen der Zielzelle anhand des T-Zell-Rezeptor CD3- Komplex in Verbindung mit dem CD4- bzw. CD8- Molekül.
2. Verstärkung der Zellverbindung durch Interaktion von Leukozytenfunktionsantigen- 1 (LFA-1) und Interzelluläres Adhäsions Molekül- 1 (ICAM-1), CD2 und Leukozytenfunktionsantigen- 3 (LFA-3).
3. Vernichtung der Zelle durch Freisetzung von Perforin und Enzymen (Henkart et al (1993)).
4. Lyse der Zielzelle, DNA Fragmentierung.

Ein alternativer Mechanismus in der zellvermittelten Vernichtung der Zielzelle besteht in der Aktivierung des Oberflächenrezeptor Fas, der zur Gruppe der CD 40- Rezeptoren gehört und Apoptosis der Zielzelle auslöst (Itoh et al (1991), Suda et al (1993)).

Weitere Mechanismen der Zytotoxizität durch die Sekretion von TNF alpha und Lymphotoxin sind beschrieben worden (Beutler et. al 1989).

### **1.3 Abwehrsystem Phagozyten**

Das Abwehrsystem Phagozyten setzt sich aus mononuklearen und granulozytären Zellen zusammen, deren Gemeinsamkeit in ihrer Fähigkeit besteht, größere Mengen partikulären Materials aufzunehmen und abzubauen.

#### 1.3.1 Neutrophile Granulozyten

### 1.3.1.1 Allgemeines

Neutrophile Granulozyten sind essentiell für die Abwehr von bakteriellen und mykotischen Infektionen. Darüber hinaus spielen sie auch eine Rolle in der Vernichtung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. Die neutrophilen Granulozyten werden zur unspezifischen Immunabwehr gerechnet. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, benötigen sie die Fähigkeiten der Mobilität, Adhäsion, Phagozytose und Mikrobizidie.

### 1.3.1.2 Generationszyklus der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden von den Stammzellen des Knochenmarks gebildet. Erste spezifische Vorläuferzelle der Granulopoese ist der Myeloblast, der noch keine Granula und viele Organellen aufweist. Im Weiteren erfolgt eine Differenzierung und Teilung der Vorläuferzellen über den Promyelozyt, Myelozyt zum Metamyelozyt. Die Metamyelozyten verlieren ihre Teilungsfähigkeit und entwickeln sich in der Reifungsphase zu stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten. Die reifen Granulozyten verweilen durchschnittlich noch zwei Tage im Knochenmark, wo sie einen Granulozytenreservepool bilden. Danach werden beim gesunden Menschen täglich  $10^{13}$  reife Granulozyten in das zirkulierende Blut abgegeben und verweilen dort mit einer Halbwertszeit von sechs Stunden, bevor sie aus dem Gefäßsystem in das Gewebe wandern. Dort verbleibt ihnen noch eine durchschnittliche Lebenszeit von ein bis zwei Tagen.

Eine Steuerungsfunktion in diesem Zellzyklus kommt dem Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und dem Granulozyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) zu. G-CSF stimuliert das Zellwachstum von Vorläuferzellen der neutrophilen Linie in vivo (Kodo et al. (1988), Duhrsen et al. (1988)) und stimuliert phagozytäre Funktionen neutrophiler Granulozyten (Weisbart et al. (1988), Nathan et al. (1989)). GM-CSF stimuliert das Wachstum von undeterminierten Stammzellen der Hämatopoese (Tomonaga et al. (1986), Clark et al. (1987)) und das Wachstum der Vorläuferzellen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Socinski et al. (1988)). GM-CSF steigert die funktionelle Aktivität von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Gasson et al. (1988), Lopez et al. (1986)). G-CSF und GM-CSF werden von Interleukin-4 in dem Wachstum von Vorläuferzellen unterstützt (Peschel et al. (1987)). Interleukin-6 unterstützt das Wachstum und die Differenzierung von Vorläuferzellen der Granulopoese in Verbindung mit GM-CSF (Carracciolo et al. (1989)). Interleukin-3 stimuliert das Wachstum von

pluripotenten Stammzellen (Williams et al (1987)). Interleukin-6 steigert synergistisch mit Interleukin-3 das Wachstum pluripotenter Stammzellen (Rennick et al. (1989)). TNF alpha stimuliert die phagozytären Funktionen von neutrophilen Granulozyten (Klebanoff et al. (1986)). Interleukin-1 (Il-1), Tumor Necrosis Factor (TNF) und Kortikosteroide steigern die Freisetzung von Granulozyten aus dem Knochenmark während der Auseinandersetzung mit Endotoxinen. Im Fall ernsthafter Infektionen ist das Knochenmark in der Lage, die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten von  $10^{13}$  auf  $10^{17}$  pro Tag zu steigern.

#### 1.3.1.3 Mobilität

Die Fähigkeit zur Mobilität neutrophiler Granulozyten ist abhängig vom aktin-haltigen Mikrofilamentsystem. Chemotaktische Faktoren zum Beispiel bewirken eine Polymerisation von Aktin und Tubulin, was zu einer erhöhten Mobilität führt.

#### 1.3.1.4 Adhäsion

Chemotaktisch aktivierte neutrophile Granulozyten zeigen eine gesteigerte Adhäsion zu postkapillären Endothelzellen. Diese gesteigerte Adhäsionsfähigkeit wird zum Teil durch Oberflächenproteine, wie Komplement-Rezeptor-1, Lymphozyten-Funktions-Antigen-1 und p150, vermittelt. Ein Fehlen der Adhäsionsproteine führt zu rezidivierenden bakteriellen Infektionen, aufgrund mangelnder Akkumulation von Granulozyten am Infektionsort.

#### 1.3.1.5 Phagozytose

Die Phagozytose von Komplement-3b, Komplement-3bi oder antikörperopsonierten Partikeln ist rezeptorvermittelt. Mechanismen der Phagozytose von inerten Substanzen, wie zum Beispiel Latex, sind nicht genauer bekannt.

#### 1.3.1.6 Mikrobizidie

Man unterscheidet zwischen sauerstoffabhängiger und sauerstoffunabhängiger mikrobizider Aktivität. Beide Systeme wirken synergistisch. Entscheidend für die sauerstoffunabhängige mikrobizide Aktivität sind Inhaltsstoffe der primären und sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten. Unter Granula versteht man membrangebundene sekretorische Kompartimente. Die

Inhaltsstoffe der Granula werden entweder durch Verschmelzung der Granula mit dem Phagosom oder durch Freisetzung der Inhaltsstoffe in das externe Milieu wirksam (Degranulation). Inhaltsstoffe der Granula sind mikrobizide Enzyme, Proteinasen und, besonders bei der sekundären Granula, einige Rezeptoren wie der fMet-Leu-Phe (FMLP), Laminin und der Komplement-Rezeptor-3, die eine Zunahme der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche bewirken (Klebanoff et al.(1988), Ambruso et al. (1981), Gallin et al. (1984)).

Zur Funktionsweise und Aktivierung der sauerstoffabhängigen Mikrobizidie siehe Kapitel 1.4.

### 1.3.2 Monozyten

Monozyten und Makrophagen nehmen, wie die neutrophilen Granulozyten, unspezifische Abwehrfunktionen im Immunsystem wahr. Wichtige Zytokine, die sie in ihrer unspezifischen Abwehrfunktion unterstützen, sind GM-CSF, Monocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF), Interferon gamma (IFN gamma), TNF alpha und TNF beta. Sie sind alle in der Lage, den "Oxidative Burst" dieser Zellen zu steigern. Monozyten werden im Knochenmark aus der pluripotenten Stammzelle gebildet, welche sich über den Mono- Myeloblast zum Monoblasten und schließlich zum Monozyten differenziert (vgl. 1.21). Monozyten werden vom Knochenmark in die Blutbahn abgegeben. Eine weitere Differenzierung zu gewebstypischen Makrophagen, wie zum Beispiel die Langerhans-Zellen der Haut, die von Kupffer-Sternzellen der Leber oder die Alveolarmakrophagen der Lunge, erfolgt nach Einwanderung der Monozyten in die entsprechenden Organe.

## 1.4 Sauerstoffanionenbildung von Phagozyten

Unter dem Einfluss verschiedener Stimulationsbedingungen werden bei Phagozyten eine Reihe von Reaktionen ausgelöst, an deren Endstrecke es unter erheblicher Steigerung der Sauerstoffaufnahme zu einer NADPH-Oxidase-abhängigen Generation von Sauerstoffradikalen kommt. Dieser Vorgang wird als "Respiratory Burst" oder, synonym, als "Oxidative Burst" bezeichnet. Die Stimulation kann rezeptorabhängig oder rezeptorunabhängig erfolgen. Rezeptoren bestehen zum Beispiel für Zytokine und Bestandteile von Bakterien wie fMet-Leu-Phe (FMLP), welche beim Abbau von Escherichia coli oder Staphylococcus aureus frei wird (Übersicht von Seifert et al. (1991)).

Eine vereinfachte Darstellung des Transduktionsweges vom Rezeptor zur Generation von Sauerstoffradikalen wird im Folgenden am Beispiel des Stimulus FMLP dargestellt. Zunächst interagiert FMLP mit dem membranständigen Rezeptor und bildet einen Rezeptor-Ligand-Komplex. Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex wird in das Zytoplasma internalisiert. Das Signal wird über Guanin-nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) fortgeleitet. G-Proteine sind membranständig und in der Lage, mit verschiedenen Rezeptor-Ligand-Komplexen zu interagieren (Jakobs et al. (1989)). G-Proteine bestehen aus einer alpha-, beta- und gamma-Untereinheit. Im inaktiven Zustand hat die alpha-Untereinheit Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gebunden. Beta- und gamma-Untereinheit des G-Proteins bilden mit der alpha-Untereinheit einen Komplex. Bei der Interaktion von G-Protein mit dem Rezeptor-Ligand-Komplex wird GDP an der alpha-Untereinheit gegen Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ausgetauscht, worauf die alpha-Untereinheit des G-Proteins von der beta-gamma-Untereinheit dissoziiert. Diese Konformationsänderung des rezeptorgebundenen G-Proteins bewirkt den Verlust der Affinität des Agonisten zum Rezeptor. Die alpha-Untereinheit der G-Proteine ist nun in der Lage, die Phospholipase C zu aktivieren (Gillman et al. (1989), Jakobs et al. (1989)).

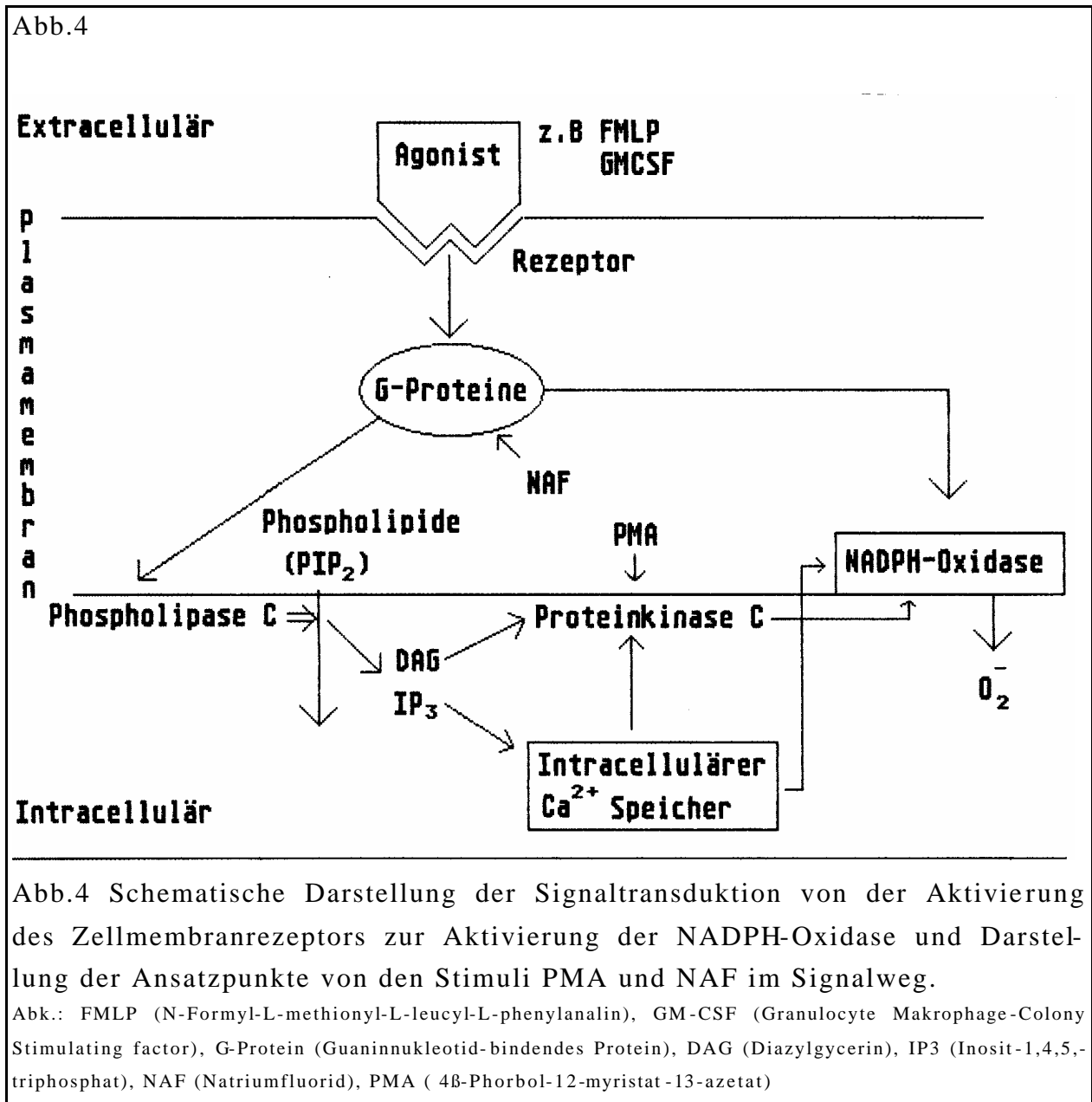
Aktiviert G-Proteine regulieren auch direkt den Aktivitätszustand der NADPH-Oxidase. So zeigen Bianca et al. (1988), daß Aktivierung der NADPH-Oxidase mit dem Stimulus Natriumfluorid (NAF) nicht mit einer Aktivierung der Phospholipase C einhergehen muss.

Die Phospholipase C ist an die Zellmembran assoziiert und bewirkt im aktivierten Zustand den Abbau von Phospholipiden aus der Zellmembran. Als Produkte dieses Abbaus von Phospholipiden entstehen die Signalmoleküle Diazylglycerin (DAG) und Inosit-1.4.5-triphosphat (IP3) (Exton et al. (1989)). IP3 bewirkt eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{++}$  aus intrazellulären Speichern (Rossi et al. (1985)). DAG aktiviert die Proteinkinase-C in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  und Phospholipiden, indem die Affinität der Proteinkinase-C zu  $\text{Ca}^{++}$  erhöht wird (Nishizuka et al. (1984), (1986)). Mit der Aktivierung der Proteinkinase-C assoziiert sich diese an das Innere der Zellmembran und phosphoryliert Proteine. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase wird mit der Phosphorylierung einer Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 44-49 kDa in Zusammenhang gebracht (Kramer et al. (1988), Seifert et al. (1991)).

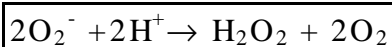
Die NADPH-Oxidase ist ein enzymatisches System, das die Bildung von  $\text{O}_2^-$  aus  $\text{O}_2$  katalysiert:



Die Regeneration des  $\text{NADP}^+$  erfolgt im Pentose-Phosphat -Zyklus.



Das gebildete  $\text{O}_2^-$  dismutiert spontan oder enzymatisch katalysiert ( z.B. Sauerstoffdismutase) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sandborg et al.(1988), Seifert et al. (1991)).



## **1.5 Wirkungsweise von Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA), Natriumfluorid (NAF) und Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF).**

### 1.5.1 PMA

PMA gehört zur chemischen Gruppe der Phorbolster. Diese lipophile Substanz ist in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Danach ist PMA in der Lage, die Proteinkinase-C direkt zu stimulieren (Gerard et al. (1986)). PMA imitiert also die Wirkung des physiologischen Stimulus DAG für die Proteinkinase-C. Wie bei der physiologischen Stimulation mit DAG, führt PMA zu einer Proteinkinase-C vermittelten Phosphorylierung von Proteinen, die in der Lage sind, die NADPH-Oxidase zu stimulieren (Seifert et al. (1991)). Siehe auch Unterpunkt 1.2.

### 1.5.2 NAF

Die Wirkungsweise von NAF auf den "Oxidative Burst" ist hauptsächlich an neutrophilen Granulozyten untersucht worden (Bianca et al. (1988), Nasmith et al.(1989), Nishizuka et al. (1988)).

NAF stimuliert neutrophile Granulozyten zur Sauerstoffanionenbildung. In der Signaltransduktion wird der Ansatzpunkt für NAF G-Protein assoziiert gesehen (English et al. (1989)). Bei Stimulation des G-Proteins mit NAF findet man distal des G-Proteins die gleichen Veränderungen wie bei der rezeptorvermittelten Stimulation des "Oxidative Burst". Bianca et al. (1988) zeigen, daß die Aktivierung der NADPH-Oxidase nicht zwangsläufig mit einer Aktivierung der Phospholipase-C verbunden sein muss. Nasmith et al. (1989) zeigen, daß die Stimulierung von neutrophilen Granulozyten mit Guanosintriphosphat (S) eine von ATP und Magnesium abhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase bewirkt, welche mit einer Tyrosinphosphorylierung verbunden ist. Diese Phospholipase-C und Proteinkinase-C-unabhängige Transduktion der Aktivierung der NADPH-Oxidase ist noch nicht sicher definiert; über die Existenz eines alternativen Transduktionsweges besteht aber Einigkeit.

### 1.5.3 GM-CSF

GM-CSF ist ein Protein aus 144 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14 bis 30 Kilo Dalton. Nach Abspaltung von 17 Aminosäuren am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende entsteht biologisch aktives GM-CSF (Clark et al. (1987)). Das Polypeptid wird auf dem Chromosom 5q23-q31 kodiert (Leewen et al. (1989)).

Die Wirkung von GM-CSF an ihren Zielzellen ist rezeptorvermittelt (Di Persio et al. (1991)). Für die Signaltransduktion ist wahrscheinlich die Tyrosinphosphorylierung eines 70 KD- und eines 93 KD- Proteins verantwortlich (Kanakura et al. (1990)).

GM-CSF gehört, zusammen mit dem Stammzellofaktor (SCF), dem Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), dem Monocyte Colony Stimulating Factor (M-CSF), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-3 (IL-3) und Erythropoetin (EPO), zu der Gruppe von Wachstumsfaktoren der hämatopoetischen Stammzellen.

In vitro unterstützt GM-CSF Wachstum und Differenzierung der Stammzellreihen der Monozyten und der neutrophilen- und eosinophilen-Granulozyten (Horiguchi et al. (1987)). Außerdem stimuliert GM-CSF in vitro das Wachstum von Megakaryozyten in Verbindung mit Interleukin-3 oder Erythropoetin (Dessypris et al. (1990)).

Zellen im menschlichen Körper, die GM-CSF sezernieren, sind Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Mesothelzellen.

GM-CSF hat neben seinen Wirkungen auf die Hämatopoese auch Wirkungen auf ausgereifte Zellen.

#### 1. Neutrophile Granulozyten

Unter dem Einfluss von GM-CSF können quantitative Veränderungen in der Expression von Oberflächenmolekülen von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Griffin et al. (1990) beschreiben zum Beispiel, daß das Adhäsionsmolekül CD11b, Neumann et al. (1990), daß die Komplement - Rezeptoren 1 und 3 vermehrt exprimiert werden. GM-CSF stimuliert den "Oxidative Burst" neutrophiler Granulozyten direkt und steigert den "Oxidative Burst" nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit chemotaktischen



Substanzen (Yuo et al. (1990)). GM-CSF steigert die Zytotoxizität und verlängert die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten (Lopez et al. (1986)).

## 2. Makrophagen

GM-CSF stimuliert die Transkription von M-CSF (Horiguchi et al. (1987)) und induziert die Produktion von TNF alpha und Interleukin-1 bei Peritonealmakrophagen (Reed et al (1990)).

GM-CSF steigert die Fragment Crystalline- (FC) abhängige Phagozytose von Gewebemakrophagen (Coleman et al. (1988)).

GM-CSF inhibiert das Wachstum von Mycobakterium tuberculosis in Makrophagen (Dennis et al. (1990)).GM-CSF steigert den "Oxidative Burst" von Monozyten und Makrophagen (Reed et al. (1987)).

## 1.6 Fragestellung

Wie in Kapitel 1.2 dargestellt, vermitteln die CD4- positiven T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 über die Freisetzung von Zytokinen einen Hauptteil der zellvermittelten Immunreaktion. Diese Zytokine modulieren sowohl den Aktivitätszustand als auch die Bildung der Effektorzellen. Darüber hinaus werden durch die Zytokinfreisetzung von CD4- positiven T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 Effektorzellen zur Freisetzung von Zytokinen angeregt, die ihrerseits in der Lage sind, die Immunreaktion zu modulieren. Insbesondere kann für einzelne Zytokine eine Stimulierung der Sauerstoffanionengeneration nachgewiesen werden. Die Bildung von Sauerstoffanionen hat eine herausragende Bedeutung für die Fähigkeit phagozytärer Zellen zur Mikrobizidie (vgl.1.3). Klinisch begleitet neben der Depletion der CD4-Lymphozyten eine Verschiebung der Relation der Fraktion der CD4- positiven Lymphozyten der Untergruppe TH1 und TH2 zugunsten von TH2 vermehrt auftretende opportunistische Infektionen (Clerici et. al 1993). Das gehäufte Auftreten von Infektionen, deren Abwehr durch CD4- Lymphozyten der Untergruppe TH1 vermittelt wird, wie zum Beispiel typische und atypische Mykobakteriosen, könnte hierdurch bedingt sein. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher die Untersuchung der Funktion der Sauerstoffanionenbildung phagozytärer Zellen.

In der Literatur finden sich einige vergleichende Untersuchungen des "Oxidative Burst" von Monozyten von Probanden mit Monozyten HIV-seropositiver Patienten. Die Ergebnisse variieren von einer signifikant supprimierten Sauerstoffanionenbildung der Monozyten von Patienten gegenüber Monozyten von Probanden bis zu einer signifikant höheren Sauer-

stoffanionenbildung der Monozyten von Patienten gegenüber Monozyten von Probanden. Das gleiche gilt für vergleichende Untersuchungen der Sauerstoffanionenbildung von Granulozyten HIV-seropositiver Patienten mit der Sauerstoffanionengeneration von Granulozyten gesunder Probanden. Es finden sich Untersuchungen, die eine supprimierte Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten gegenüber Granulozyten von Probanden beschreiben, und Untersuchungen, die zum gegensätzlichen Ergebnis gelangen.

Ziel dieser Arbeit war es, die rezeptor-, die G-Protein- und die Proteinkinase-C-abhängigen Stimulationen des "Oxidative Burst" anhand verschiedener Stimuli zu messen. In den publizierten Untersuchungen wurden zum Teil nicht dieselben Stimulanzen verwendet. Sie unterscheiden sich in ihrem Ansatzpunkt in der Signaltransduktion und in ihrer Intensität, mit der sie den "Oxidative Burst" stimulieren.

In der Untersuchung wurde versucht, ein Patientenkollektiv zu untersuchen, das einen möglichst weiten Ausschnitt in der Progression der Erkrankung von der Infektion bis zum Vollbild AIDS erfasst. Als Richtgröße für die Progression der HIV-Erkrankung haben wir die Anzahl der CD4- positiven T-Lymphozyten gewählt. Dies erschien uns günstiger als die CDC-Klassifikation zu verwenden, da in dieser, in der AIDS-Gruppe Erkrankungen zusammengefasst werden, die immunologisch möglicherweise einen unterschiedlichen Hintergrund haben, wie zum Beispiel die atypischen Mykobakterien und das Kaposi-Sarkom.

Ziele der Untersuchung:

1. Aktivierung von Phagozyten durch physiologische und unphysiologische Stimuli bei HIV-infizierten Patienten und gesunden Probanden.
2. Zellaktivierung von Phagozyten bei HIV-infizierten Patienten durch physiologische und unphysiologische Stimuli in Abhängigkeit vom Grad der zellulären Immunsuppression.