

5. Diskussion

Die HIV-Infektion geht klinisch mit einer Depletion der CD4 T-Lymphozyten einher. Mit sinkender CD4 T-Lymphozytenzahl werden unter anderem vermehrt Infektionen beobachtet, für deren Bekämpfung die Immunreaktion vom verzögerten Typ eine übergeordnete Rolle spielt. Dieser Typ von Immunreaktion wird im wesentlichen von CD4-positiven T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 induziert. Eine Differenzierung der CD4 T-Lymphozyten in CD4 T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 erfolgt abhängig von der Menge des präsentierten Antigens, der Zytokine, die während des Differenzierungsvorgangs vorherrschen und von der Art der antigenpräsentierenden Zelle. Kennzeichnend für CD4 T-Lymphozyten der Untergruppe TH1 sind die sezernierten Zytokine über die die Immunreaktion moduliert wird. So werden von CD4-positiven Lymphozyten der Untergruppe TH1 insbesondere durch TNF, Lymphotoxin und Interferon gamma die zellvermittelte Immunreaktion über Granulozyten und Monozyten und Makrophagen exprimiert. Indirekt wird über die Induktion einer vermehrten Bildung von Interleukin-12 durch Makrophagen auch die Aktivität der NK-Zellen stimuliert. Zusammenfassend wird der Reaktionstyp der verzögerten Immunreaktion durch CD4-positiv TH1 T-Lymphozyten gefördert während der allergische Reaktionstyp über CD4 T-Lymphozyten der Untergruppe TH2 gefördert wird. Zwischen diesen beiden Untergruppen von T-Lymphozyten besteht eine gegenseitige negative Rückkopplung. CD4 Lymphozyten der Untergruppe TH1 hemmen CD4 Lymphozyten der Untergruppe TH2 über Interferon gamma. CD4 Lymphozyten der Untergruppe Th2 hemmen CD4 Lymphozyten der Untergruppe TH1, Makrophagen und NK Zellen über Interleukin-10. Während der Krankheitsprogression werden sowohl eine Depletion der CD4-positiven T-Lymphozyten gesehen, als auch eine Verschiebung der Relation der Untergruppen der CD4-positiven Lymphozyten TH1 und TH2 zugunsten der Untergruppe TH2. Diese Befunde könnten eine Hemmung der verzögerten Immunreaktion erklären.

5.1 Ergebnisse GM-CSF

Durch Vorinkubation mit rekombinantem GM-CSF konnte die PMA-stimulierte Sauerstoffanionenbildung bei Monozyten und Granulozyten signifikant gesteigert werden. Dies bezog sich sowohl auf HIV-seropositive Patienten- und Probandenzellen. Die Sauerstoffanionenbildung NAF-stimulierter Zellen ließ sich durch das Vorinkubieren mit GM-CSF nicht steigern. In der Literatur finden sich mehrere Untersuchungen (Nathan et al. (1989), McColl et al. (1990)), die die Fähigkeit von GM-CSF belegen, die Sauerstoffanionenbildung durch Vorinkubieren von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten zu steigern. Ein relevanter Unterschied in der Steigerungsfähigkeit der Sauerstoffanionenbildung durch Vorinkubieren mit GM-CSF ließ sich zwischen Probanden und Patienten nicht feststellen.

5.2 Ergebnisse Monozyten

Monozyten von Probanden ließen sich durch die Stimulation mit NAF oder PMA zu einer gesteigerten Sauerstoffanionengeneration, verglichen mit unstimulierten Monozyten, anregen. Die Stimulation der Monozyten von Probanden mit PMA zeigte eine stärkere Sauerstoffanionenbildung verglichen mit der Stimulation mit NAF. Diese Ergebnisse zeigten sich auch bei Monozyten von Patienten. Im Vergleich zwischen der Sauerstoffanionengeneration der Monozyten von Patienten zeigten Monozyten von Probanden in der vorliegenden Untersuchung eine höhere, jedoch nicht signifikant höhere Sauerstoffanionenbildung nach Stimulation mit PMA oder NAF. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Polli et al. (1985) und Spear et al. (1990), die eine signifikant niedrigere Sauerstoffanionenbildung der Monozyten von Patienten nach PMA-Stimulation zeigten (Polli et al. konnte dieses Ergebnis nur für neutrophile Granulozyten von Lympho-Adenopathy-Syndrom (LAS)-Patienten zeigen). Unterstützt werden die vorliegenden Ergebnisse durch Veröffentlichungen von Bandres et al. (1993), Dukes et al. (1993), Nielsen et al. (1986), und Nottet et al. (1993), die ebenfalls kein Defizit in der Freisetzung von Sauerstoffanionen sahen. Konopka et al. (1992) zeigten an menschlichen monozytären Leukämiezellen, die in vitro mit HIV-1 infiziert wurden, daß keine zytopathischen Effekte nachweisbar sind.

Zusammenfassend kann angenommen werden, daß kein Defekt in der Sauerstoffanionenbildung von Monozyten HIV-infizierter Patienten besteht. Die höhere Sauerstoffanionenbildung der Patientenzellen könnte Ausdruck

einer Aktivierung der Monozyten von Patienten sein. Clouse et al. (1991) zeigten, daß das HIV-1 Glykoprotein 120 Monozyten zur Produktion von GM-CSF und TNF alpha stimuliert, welche ihrerseits die Sauerstoffradikalproduktion steigern können.

5.3 Ergebnisse neutrophile Granulozyten

In verschiedenen Arbeiten wurde die In-vitro-Fähigkeit der Granulozyten von Patienten zur Chemotaxis, Phagozytose und zum intrazellulären Inaktivieren von Bakterien gegenüber Granulozyten von Probanden als herabgesetzt beschrieben (Ellis et al. (1988), Murphy et al. (1988), Lazzarin et al. (1986)).

Die In-Vitro-Sauerstoffanionenbildung von neutrophilen Granulozyten wurde in den vorliegenden Arbeiten unterschiedlich gemessen. Bandres et al. (1993) und Murphy et al. (1988) beschrieben eine signifikant gesteigerte Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten gegenüber Granulozyten von Probanden. Nielsen et al. (1986) fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sauerstoffanionenbildung von Granulozyten HIV-seropositiver Patienten und Granulozyten gesunder Probanden. Gabrilovich et al. (1994) berichteten von einer signifikant niedrigeren Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten gegenüber den Granulozyten von Probanden.

Für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten verschiedene Untersuchungsvoraussetzungen verantwortlich sein. So sind die gewählten Patientenkollektive hinsichtlich der Progression der Erkrankung nicht vergleichbar. Die Einnahme von Medikamenten könnte einen Einfluss auf die Sauerstoffanionenbildung haben. Zusätzlich unterscheiden sich die Untersuchungen hinsichtlich ihrer Separations- und Untersuchungsmethode (Chemiluminescence, Reduktion von Cytochrom C, Messungen im serumfreien oder serumhaltigen System, verschiedene Messzeitpunkte, Benutzung unterschiedlicher Stimulanzen).

Granulozyten von Probanden ließen sich durch die Stimulation mit NAF oder PMA zu einer gesteigerten Sauerstoffanionenbildung, verglichen mit unstimulierten Granulozyten, anregen. Die Stimulation der Granulozyten gesunder Probanden mit PMA zeigte eine stärkere Sauerstoffanionengeneration im Vergleich mit der NAF-Stimulation. Diese Ergebnisse zeigten sich auch bei Granulozyten HIV-seropositiver Patienten.

Im Vergleich der Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Probanden mit der Sauerstoffanionengeneration von Patienten zeigten die Granulozyten der Probanden bei Stimulation mit NAF eine signifikant niedrigere Sauerstoffanionenbildung. Die höhere Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten nach NAF-Stimulation kann als Aktivierung dieser Zellen verstanden werden. Sie könnte durch eine Zellinfektion mit HTLV-3 verursacht worden sein. Gabrillovitch et al. (1992-1) zeigten, daß in 31,25% der Blutproben das HI-Virus mittels Polymerase Chain Reaction nachgewiesen werden kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Spear et al. (1990). Sie bewiesen darüber hinaus in Zeitversetzten Messwiederholungen, daß der Nachweis von HIV-DNA bei Patienten nicht konstant ist und nicht mit dem Fortschreiten der Erkrankung zusammenhängt (HIV war in neutrophilen Granulozyten von Aids-Patienten nicht häufiger nachweisbar als bei asymptomatischen HIV-seropositiven Patienten). Zudem war die von ihnen errechnete Infektionsrate der neutrophilen Granulozyten so gering, daß keine Beeinflussung der Sauerstoffanionenbildung zu erwarten war.

Weiterhin könnten die neutrophilen Granulozyten in vivo durch immunologische Prozesse im Rahmen der HIV -Infektion aktiviert worden sein. Dafür kommen TNF-alpha, TNF-beta, G-CSF und GM-CSF als Zytokine in Frage, die in der Lage sind, den oxidativen Metabolismus zu steigern (Kapp et al. (1990), Kownatzki et al. (1988) und Nathan et al. (1989)). Übereinstimmend mit dieser These legten Gabrillovich et al. (1993) dar, daß FMLP-stimulierte Granulozyten von Probanden in Gegenwart von Patientenserum eine höhere Sauerstoffanionenbildung erbringen als in Gegenwart von Probandenserum. Außerdem konnten Gabrillovich et al. (1992-2) zeigen, daß die Granulozyten von Probanden, die mit Überstand stimulierter Monozyten von Patienten inkubiert wurden, eine höhere Sauerstoffanionenbildung zeigen als Granulozyten von Probanden, die mit dem Überstand stimulierter Monozyten von Probanden inkubiert wurden. Die Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Probanden wurde unter dem Stimulus FMLP gemessen. Gabrillovich et al. folgerten, daß Monozyten (eine) Substanz(en) bilden, die die Sauerstoffanionenbildung von neutrophilen Granulozyten steigern. Unklar bleibt, ob es sich dabei um Zytokine, HIV-Antigene oder HIV-assoziierte Proteine handelt. Für einen direkten Einfluss von HIV-Antigenen bzw. HIV-assoziierten Proteinen sprechen der Nachweis eines direkt aktivierenden Einflusses eines HIV-Envelope-Fragments und die Beobachtung der gegensinnigen Korrelation von Serumspiegel der HIV-Antikörper mit der

Sauerstoffanionenbildung der neutrophilen Granulozyten (Gabrillovich et al. (1991)).

Im Gegensatz zu der signifikant höheren Sauerstoffanionengeneration der Granulozyten von Patienten im Vergleich mit Granulozyten von Probanden nach Stimulation mit NAF zeigte sich bei den Untersuchungen von Granulozyten nach der Stimulation mit PMA eine signifikant niedrigere Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten im Vergleich mit Granulozyten von Probanden. Die Sauerstoffanionenbildung der Granulozyten von Patienten korrelierte negativ mit der Anzahl CD4-positiver T-Lymphozyten.

Dieses gegensätzliche Ergebnis im Vergleich zur Untersuchung mit dem Stimulus NAF kann bei sonst identischen Untersuchungsbedingungen nur mit der unterschiedlichen Wirkungsweise der Stimuli begründet werden. Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) bindet spezifisch an die Ca^{++} - und phospholipideabhängige Proteinkinase-C (Nishizuka (1984), (1986), (1988)). Natriumfluorid (NAF) aktiviert direkt G-Proteine. G-Proteine stimulieren im weiteren Signalweg die Phospholipase C (Orellana (1987), Taylor (1991)). Dies führt, vermittelt über den Abbau von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat, zum Anstieg von Inosit-1,4,5,-triphosphat (IP3) und Diazylglycerin (DAG). IP3 mobilisiert Ca^{++} aus intrazellulären Speicherräumen. Wie PMA aktiviert auch DAG die Proteinkinase-C. Die Proteinkinase-C phosphoryliert Membranproteine und moduliert auf diese Weise Funktionszustände von Enzymen (Nishizuka (1984), (1986), (1989)) und führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Omann (1987), Seifert (1991)). Die NADPH-Oxidase wird wahrscheinlich mittels einer Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 44-49 kDa, die von der Proteinkinase-C phosphoryliert werden, stimuliert (Rossi et al. (1986)).

Zusammenfassend könnte die in Bezug zu der Sauerstoffanionenbildung von Granulozyten gesunder Probanden höhere Sauerstoffanionengeneration von Granulozyten HIV-seropositiver Patienten nach NAF-Stimulation und niedrigere Sauerstoffanionenbildung von Granulozyten HIV-seropositiver Patienten nach PMA-Stimulation grundsätzlich mit der differierenden Intensität der Zellstimulation zusammenhängen oder durch den unterschiedlichen Ansatzpunkt der Stimulanzen im Signalweg bedingt sein.

Die Stimulation mit PMA führt in der vorliegenden Untersuchung bei Granulozyten von Patienten zu einer ungefähr doppelt so hohen Sauerstoffanionenbildung wie bei der Stimulation mit NAF. Die Stimulation mit PMA gilt

als maximale Stimulation der Sauerstoffanionenbildung bei neutrophilen Granulozyten. Es könnte sein, daß Defizite im Signalweg bzw. am System der NADPH-Oxidase erst unter maximaler Belastung sichtbar werden. Denkbar wären zum Beispiel eine mangelnde Energiebereitstellung durch den Pentosephosphatzyklus oder eine reduzierte Proteinsynthese der neutrophilen Granulozyten mit der Folge erniedrigter Proteinkinase-C-Konzentrationen oder deren Substrate.

G-Proteine sind in der Lage, die NADPH-Oxidase direkt und über die Aktivierung der Phospholipase C, und folgend, der Phosphokinase C zu stimulieren. Ein Mangel an Phospholipase C, Phosphokinase C oder an ihren Substraten könnte durch die direkte Stimulierung der NADPH-Oxidase mittels der G-Proteine bei Stimulation mit NAF verdeckt geblieben sein.

Untersuchungen von Ward et al. (1995) legen nahe, daß die HIV-Antigene für die Hemmung der Sauerstoffanionengeneration der Granulozyten von HIV-seropositiven Patienten verantwortlich sein könnten. Ward et al. zeigen, daß das synthetisch hergestellte Hüllprotein gp 41 gereinigte Proteinkinase-C hemmt. Damit wäre indirekt auch eine Hemmung der NADPH-Oxidase erklärbar. Außerdem könnte hiermit das Ergebnis indirekt erklärt werden, daß die Anzahl CD4-positiver T-Lymphozyten der Patienten positiv mit der Sauerstoffanionenbildung nach PMA-Stimulation korreliert, da mit sinkender Anzahl CD4-positiver T-Lymphozyten die Virusbelastung des Blutes steigt. Dies ist darüber hinaus eine Beobachtung, die einige klinische Befunde, wie zum Beispiel die hohe Erkrankungsfrequenz mit einer Sepsis oder bakteriellen Pneumonie bei HIV-Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium, gut erklärt. In Versuchen mit neutrophilen Granulozyten von HIV-seropositiven Patienten konnte gezeigt werden, daß diese in vitro eine eingeschränkte Fähigkeit zeigen, phagozytierte Bakterien zu inaktivieren. In diesem Prozess spielt die Generation von Sauerstoffanionen eine entscheidende Rolle.

Als weiterer Erklärungsansatz kann eine Untersuchung von Nokta et al. (1994) dienen, in der gezeigt wird, daß der Gehalt des Enzyms Proteinkinase-C in Monozyten von HIV-seropositiven Patienten niedriger ist als in Monozyten von Kontrollprobanden und daß die Aktivität der Proteinkinase-C bei Monozyten von HIV-Patienten durch PMA im Gegensatz zu Monozyten von Probanden nicht induzierbar ist. Nokta et al. folgern, daß die Generation und die Aktivierung der Proteinkinase-C bei Monozyten von HIV-seropositiven Patienten eingeschränkt ist.

Dieses Ergebnis ist bei dem derzeitigen Kenntnisstand schwer einzuordnen, da unklar bleibt, weshalb in der vorliegenden Untersuchung bei Monozyten von HIV-seropositiven Patienten keine Beeinträchtigung der PMA-induzierten Sauerstoffanionengeneration gesehen wurde. Außerdem muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Nokta et al. (1994) auf Granulozyten in Frage gestellt werden.