

Aus dem
Charité Centrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Medizinische Klinik I, Gastroenterologie, Infektiologie, Rheumatologie
Direktor: Professor Dr. Martin Zeitz

Einfluss lokaler und systemischer mukosaler Infektionen auf Barrierefunktion und Immunsystem der Darmschleimhaut

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Hans-Jörg Epple
Berlin

Eingereicht: September 2010

Dekanin: Professorin Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Professor Dr. med. Tilman Sauerbruch

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. et med. Frank Kirchhoff

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die intestinale Mukosa: Grenzfläche zwischen „Innen“ und „Außen“	5
1.1.1	Die Barriere- und Transportfunktion des intestinalen Epithels	6
1.1.2	Die intestinale Mukosa als immunologisches Organ	8
1.2	Die HIV-Infektion ist eine Infektion der intestinalen Mukosa.....	10
1.3	Zielsetzung und Fragestellung.....	12
2	Ergebnisse	15
2.1	Effekt von Cholera-toxin auf die epitheliale Muzin- und Chloridsekretion.....	15
2.2	Induktion eines Barriere-defekts durch TNF- α im HT-29/B6-Modell.....	16
2.3	Mechanismus der Diarrhoe bei der enteralen Aeromonas-Infektion.....	17
2.4	Bakterielle Translokation durch Hämolyisin-induzierte fokale Epitheldefekte	18
2.5	Intestinale Barriere und mukosale T-Zellen bei der akuten HIV-Infektion	19
2.6	Mechanismen des HIV-induzierten Barriere-defekts	20
2.7	Erhöhte Zytokinexpression in der Kolonmukosa von HIV-Infizierten.....	21
2.8	Zunahme regulatorischer T-Zellen in der Dünndarmmukosa von HIV-Infizierten ..	22
3	Diskussion	24
3.1	Epitheliale Schädigungsmuster bei mukosalen Infektionen.....	25
3.2	HIV-Infektion, Barrierefunktion und mukosale Immunaktivierung	29
4	Zusammenfassung	36
5	Literatur	41
6	Danksagung	50
7	Erklärung	51

1 Einleitung

Die mukosale Oberfläche des Intestinums stellt die größte Grenzfläche zwischen dem menschlichen Körper und der Umwelt dar. Dabei bildet das einschichtige Epithel der gastrointestinalen Mukosa die Trennschicht zwischen dem Körperinneren und der im Lumen des Gastrointestinaltrakts sich befindenden, quasi in den Körper „hineingestülpten“ Außenwelt. Über das Epithel der Darmschleimhaut erfolgt die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen sowie die Resorption und Sekretion von Elektrolyten. Die bedarfsgerechte Regulation dieser Transportfunktionen, zusammen mit entsprechenden Funktionen des Nierentubulusepithels, sorgt für ein konstantes „milieu intérieur“, das eine unabdingbare Voraussetzung für den physiologischen Ablauf der meisten Körperfunktionen darstellt.¹

Gerichtete Transportvorgänge setzen voraus, dass verschiedenen Kompartimente durch eine mehr oder weniger durchlässige Barriere voneinander getrennt sind. Seine Eigenschaft als Diffusionsbarriere ist somit eine grundlegende Qualität des intestinalen Epithels, welche die Voraussetzung für „höhere“ Transport- und Barrierrefunktionen der Darmschleimhaut bildet. Die Barrierfunktion der gastrointestinalen Mukosa geht aber über die einer reinen Diffusionsbarriere weit hinaus. Die intestinale Mukosa befindet sich in einem Zustand der stetigen Exposition gegenüber einer immensen Zahl von teils oral aufgenommenen, teils den Darm resident besiedelnden Keimen. Daher fungiert die Schleimhaut des Intestinums auch als die wichtigste strukturelle und immunologische Barriere des Körpers gegenüber den Mikroorganismen der Umwelt.

Obwohl die intestinale Mukosa höchst unterschiedliche und divergente Aufgaben wahrnimmt, sind ihre immunologischen und epithelphysiologischen Partialfunktionen auf vielfältige Weise miteinander verbunden. Beispielsweise wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass Zytokine, die als Folge entzündlicher oder infektiöser Stimuli von mukosalen Immunzellen freigesetzt werden, durch Induktion epithelialer Apoptosen²⁻⁵ und/oder durch Modulation der Protein-Zusammensetzung epithelialer Schlussleisten⁶⁻¹¹ starke Effekte auf die Barrierfunktion ausüben können. Umgekehrt kann eine abnorm durchlässige epitheliale Barriere durch gesteigerte Translokation von Nahrungsantigenen oder bakteriellen Antigenen eine Aktivierung des mukosalen Immunsystems nach sich ziehen, wie es als Pathomechanismus der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa diskutiert wird.¹²⁻¹⁶ Bei der intestinalen Mukosa handelt es sich somit um ein hoch differenziertes Organ, in dem komplexe und divergente strukturelle,

physiologische und immunologische Funktionen eng ineinandergreifen. Eine Störung der Integrität der Darmmukosa birgt folglich das Risiko gravierender schädlicher Folgen für den Organismus.

Neben entzündlichen Darmerkrankungen sind es insbesondere Infektionen, die die Integrität der Darmmukosa kompromittieren können. Tatsächlich ist der Gastrointestinaltrakt aufgrund des mit der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme assoziierten Expositionsrisikos ein bevorzugter Schauplatz von Infektionen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Infektionen des Magen-Darm-Trakts zu den häufigsten Infektionen überhaupt gehören. Während sie in Entwicklungsländern – insbesondere bei Kindern – mit hoher Mortalität behaftet sind,¹⁷ steht in Industrienationen die mit ihnen assoziierte Morbidität im Vordergrund, durch welche den infektiösen Enteritiden hier eine erhebliche medizinökonomische und volkswirtschaftliche Bedeutung zukommt.^{18, 19}

Enterale Infektionen bleiben meist auf den primären Infektionsort, die Darmschleimhaut, begrenzt. Dort bewirken die Erreger und/oder ihre Toxine pathologische Veränderungen der Mukosa mit direkter oder indirekter Schädigung der Lamina epithelialis. Folge dieser Schädigung sind Störungen der epithelialen Transport- und Barrierefunktion, die sich klinisch am häufigsten in Form einer akuten Diarrhoe manifestieren. Die Darmschleimhaut ist aber nicht nur Schauplatz von Lokal-, sondern auch von systemischen Infektionen. Hierfür ist die HIV-Infektion ein paradigmatisches Beispiel. Durch einen Tropismus des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) zu den Lymphozyten der Darmmukosa ist nämlich die intestinale Mukosa eines der wichtigsten Zielorgane der HIV-Infektion überhaupt.²⁰⁻²³ Weil die in der Darmmukosa lokalisierten CD4-positiven T-Lymphozyten „ideale“ Zielzellen für das HIV darstellen,²⁴ führt die HIV-Infektion – unabhängig von Transmissionsmodus und Eintrittspforte – zu einer schweren lokalen CD4-Zell-Depletion und zu weiteren gravierenden Veränderungen im mukosalen Immunsystem des Intestinaltrakts.^{22, 24-26} Diese induzieren über zunehmend besser verstandene Mechanismen eine Schädigung von Struktur und Funktion des intestinalen Epithels.²⁷⁻²⁹ Die resultierenden strukturellen und funktionellen Defekte wiederum verstärken und unterhalten eine systemische Immunaktivierung und beeinflussen dadurch in erheblicher Weise den natürlichen Verlauf der HIV-Infektion.^{30, 31} Die mukosalen Vorgänge bei der HIV-Infektion verdeutlichen somit exemplarisch die oben erläuterte Verschränkung physiologischer und immunologischer Funktionen der intestinalen Mukosa.

In Anbetracht ihrer großen Bedeutung besteht ein erhebliches wissenschaftliches Interesse an einem besseren Verständnis der Interaktion zwischen enteralen Lokal- und Systeminfektionen mit Barriere- und Transportfunktion sowie mit dem lokalen Immunsystem der intestinalen Mukosa. Im Folgenden werden einige zentrale Funktionen und Strukturen der intestinalen Mukosa vorgestellt, soweit diese für das Verständnis der experimentellen Arbeiten von Bedeutung sind. Eine kurze Einführung in die immunologischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen der Darmschleimhaut bei der HIV-Infektion verdeutlicht dann die enge Verzahnung des mukosalen Immunsystems mit der Barrierefunktion der intestinalen Mukosa.

1.1 Die intestinale Mukosa: Grenzfläche zwischen „Innen“ und „Außen“

Die Abgrenzung von Flüssigkeitsräumen ist ein grundlegendes Bau-Prinzip des Lebens, das auf allen Struktur-Ebenen zu finden ist: subzellulär auf Organellen-Ebene, auf der Ebene der einzelnen Zelle, die sich durch eine hochdifferenzierte Zellmembran zur kleinsten Einheit des Lebens konstituiert, und ebenso auf der Ebene komplexer Organismen, die ihr inneres Milieu mithilfe spezialisierter epithelialer Oberflächen gegenüber der Umwelt abgrenzen und konstant halten.¹ Beim Menschen wird letztere Funktion in wesentlichen Teilen von der intestinalen Mukosa des Intestinaltrakts getragen. Sie stellt die größte und wichtigste Kontaktfläche des Körpers mit der Umgebung dar und muss zwei völlig verschiedene Aufgaben erfüllen.

Erstens muss sie eine selektive Diffusionsbarriere aufrecht erhalten und Nährstoffe und Wasser über diese Barriere ins Körperinnere hinein- oder aus diesem heraustransportieren. Diese Barriere- und Transportfunktionen sind eine Leistung des intestinalen Epithels und funktionell eng miteinander verbunden. Das Vorhandensein einer Diffusionsbarriere ermöglicht nämlich erst den durch die Aktivität membranärer Transportproteine vermittelten Aufbau von elektrochemischen und osmotischen Gradienten. Anders ausgedrückt: ein aktiver vektorieller Transport eines Solut ist nur dann möglich, wenn dieser Transport über eine Barriere hinweg erfolgt, welche eine quantitative Rückdiffusion verhindert.¹

Zweitens verhindert die intestinale Mukosa das Eindringen pathogener Erreger und anderer luminaler Antigene und übt dadurch eine wichtige immunologische Barrierefunktion aus. Neben der mechanischen Barriere des Epithels und den in der

Mukosa realisierten Mechanismen des angeborenen Immunsystems wird diese Funktion in entscheidender Weise von den in der Darmmukosa lokalisierten Anteilen des erworbenen Immunsystems aufrecht erhalten.³²

1.1.1 Die Barriere- und Transportfunktion des intestinalen Epithels

Die Diffusionsbarriere gegenüber den luminalen Inhalten des Intestinums setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Auf der luminalen Oberfläche des Epithels befindet sich eine Schleimschicht. Ihre strukturbildenden molekularen Hauptbestandteile sind Muzine, große Glykoproteine, die von spezialisierten Epithelzellen sezerniert werden. Der Diffusionswiderstand der Schleimschicht (epithelphysiologisch ein so genannter „unstirred layer“) für niedermolekulare Substanzen ist im Vergleich zu demjenigen der Epithelschicht vernachlässigbar.³³ Bedeutender ist die Rolle der Schleimschicht als Barriere für den Durchtritt von Makromolekülen und (potentiell pathogener) Mikroorganismen (s.u.).

Die entscheidende strukturelle Diffusionsbarriere bildet die Lamina epithelialis, das einschichtige Zylinderepithel der Darmmukosa. Dieses Epithel besteht aus einer einzigen Schicht hochdifferenzierter polarisierter Epithelzellen, die in ihrem apikalen Bereich durch Schlussleisten (tight junctions) verbunden sind.^{1, 34} Die Schlußleisten erfüllen eine doppelte Funktion. Zum Einen trennen sie die apikale (dem Lumen zugewandte) von der basolateralen (dem Lumen abgewandten) Domäne der Enterozytenzellmembran. So verhindern sie die Durchmischung apikaler und basolateraler Membranproteine und erhalten dadurch die Polarisierung der Epithelzellen, d. h. die asymmetrische Anordnung der Transportproteine, die einen vektoriellen Transport erst möglich macht. Zum Anderen bilden sie eine mehr oder weniger durchlässige Barriere für den parazellulären Solut-Transport.³⁵

Resorption und Sekretion - transepithelialer Transport vom Lumen in das Interstitium oder umgekehrt vom Interstitium in das Lumen - kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen. Der *transzelluläre* Weg führt durch die apikale und basolaterale Membran der Epithelzellen. Da die Lipidstruktur der Zellmembran für wasserlösliche Solute kaum permeabel ist, erfolgt der transzelluläre Transport hydrophiler Solute unter Vermittlung spezifischer Transportproteine. Dieser Transport kann unter Energieverbrauch auch gegen einen Diffusionsgradienten erfolgen (so genannter aktiver Transport).^{1, 35} Der *parazelluläre* Weg führt, wie bereits erwähnt, durch die tight junction. Parazellulärer Transport erfolgt rein passiv, entlang von Diffusionsgradienten. Sein Ausmaß wird durch die

Durchlässigkeit der Schlußleisten bestimmt, die wiederum durch Interaktion mit dem Zytoskelett und durch die Proteinzusammensetzung der Schlußleisten determiniert wird.³⁵

In letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Kenntnis der Struktur und Zusammensetzung der tight junction erzielt. gemäß dem aktuellen Kenntnisstand wird das Maschenwerk der tight junction von Mitgliedern aus vier Proteinfamilien gebildet: dem Occludin, dem Tricellulin, den Claudinen und dem JAM (junctional adhesion molecule).³⁶ Diese Proteine verbinden benachbarte Epithelzellen miteinander, verschließen die Interzellularspalten und sind über intrazelluläre Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin, AF-6, AF-7 u. a.) mit dem Zytoskelett der Epithelzellen verbunden.^{37, 38}

Entsprechend der oben skizzierten transepithelalen Transportwege kann eine Perturbation der mukosalen Barriere- und Transportfunktion entweder zellulär, d. h. durch Veränderungen der Enterozyten, oder parazellulär, durch Veränderungen der Schlussleisten, erfolgen und entsprechend lassen sich auch die molekularen Ansatzpunkte enteraler Erreger klassifizieren.^{1, 34, 39-41}

Perturbationen auf *zellulärer* Ebene betreffen die Leitfähigkeiten und Transportaktivitäten der apikalen und basolateralen Zellmembran. Zur Nährstoff- und Wasserresorption sowie zur Konstanthaltung des inneren Milieus wird im intestinalen Epithel eine Vielzahl von Transportproteinen exprimiert. Ihre Verteilung, Dichte und ihr Aktivierungszustand im apikalen und basolateralen Zellmembrankompartiment unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen.³⁵ Diese Transportproteine bzw. die ihnen vorgeschalteten Regulationskaskaden sind wichtige molekulare Ziele bakterieller oder viraler Virulenzfaktoren. Klassische Beispiele sind das Cholera toxin oder das hitzelabile Enterotoxin von Enterotoxischen Escherichia coli, deren sekretorische Wirkung auf einer enormen Steigerung der apikalen Chloridleitfähigkeit durch Aktivierung apikaler Chloridkanäle beruht.^{42, 43}

Die *parazelluläre* Durchlässigkeit wiederum wird über das zelluläre Zytoskelett und über qualitative und quantitative Veränderungen in der Protein-Zusammensetzung der Schlussleisten geregelt.^{38, 44 37} Darüber hinaus führen gesteigerte epitheliale Apoptoserate oder nekrotischer Zelluntergang von Epithelzellen ebenfalls zu einer Steigerung des Teilchen- und Wassertransports über den parazellulären Weg.^{3, 4, 9, 27} Auch Strukturen des parazellulären Weg sind Ziele von bakteriellen Toxinen. Ein Beispiel ist das Bacteroides fragilis Enterotoxin, das dazu in der Lage ist das intrazelluläre tight junction Protein ZO-1

zu spalten.⁴⁵ Andere Beispiele sind das Clostridium perfringens Enterotoxin, das über direkte Bindung an Claudin-3 und Claudin-4 Poren in der apikalen Zellmembran bildet und die Schlußleistenstruktur verändert,⁴⁰ und das Clostridium difficile Toxin A, das über eine Störung des apikalen D-Aktin-Rings zu einer Dissoziation von Occludin, ZO-1 und ZO-2 aus dem tight junction-Komplex führt.⁴⁶

Physiologischerweise unterliegen die epithelialen Transport- und Barrierefunktionen einer Vielzahl externer endokriner, parakriner, inflammatorischer und nervaler Regulationsmechanismen. All diese Einflüsse werden aber im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke vom Epithel integriert. Um den direkten Effekt von Enteropathogenen auf das Epithel zu untersuchen, aber auch um die funktionelle Auswirkungen von „upstream“ mediierten, indirekten Effekten zu analysieren, ist es sinnvoll, einen experimentellen Ansatz zu verfolgen, in dem Transport- und Barriereigenschaften an einem isolierten Darmepithel quantifiziert werden können. Zu diesem Zweck haben wir ein experimentelles System entwickelt, in dem polarisiert wachsende und funktionelle Schlußleisten ausbildende Monolayer hochdifferenzierter Kolonozyten (HT-29/B6)⁴⁷ hinsichtlich ihrer Transport- und Barriereigenschaften charakterisiert und zur Analyse von Pathomechanismen enteraler Infektionen verwendet wurden. Durch die Abwesenheit subepithelialer Strukturen ist dieses System sehr gut geeignet, die Reaktionen des Epithels isoliert zu betrachten.

1.1.2 Die intestinale Mukosa als immunologisches Organ

In Anbetracht des stetigen Stroms einer immensen Zahl von Antigenen und potentiell pathogenen Keimen durch das Intestinum, bildet die gastrointestinale Mukosa die wichtigste immunologische Barriere des Körpers gegenüber seiner Umwelt. Zahlreiche Komponenten tragen zur Funktion der immunologischen Barriere der intestinalen Mukosa bei. Die Epithelschicht, d. h. der durch Schlußleisten fest miteinander verbundene Monolayer der Enterozyten bildet eine physische Barriere gegen die Penetration von Pathogenen aus dem Darmlumen. Zusätzliche physische Hindernisse sind die aus Muzinen und Zelldetritus gebildete Mukusschicht sowie die Glykokalix auf der Oberfläche des Epithels. Eine weitere biologische Barriere entsteht durch die mukosale Produktion und Sekretion antimikrobiell wirksamer Moleküle und weitere in der Mukosa aktiven Mechanismen der angeborenen Immunabwehr.⁴⁸⁻⁵⁰

Die zentrale Bedeutung der intestinalen Mukosa für das menschliche Immunsystem ergibt sich aber vor allem aus den hier strukturell verankerten Funktionen

der adaptiven Immunabwehr. Der Gastrointestinaltrakt enthält nämlich die Mehrzahl der T-Zellen und der Makrophagen des Körpers und repräsentiert somit das größte immunologische Organ des Menschen. Nach funktionellen Gesichtspunkten kann im Immunsystem der Darmmukosa, für das sich im wissenschaftlichen Sprachgebrauch die Akronyme MALT („Mucosa Associated Lymphoid Tissue“) oder GALT („Gut Associated Lymphoid Tissue“) etabliert haben, ein Induktor- und ein Effektorkompartiment unterschieden werden. Das Induktorkompartiment besteht aus den mesenterialen Lymphknoten, den Peyerschen Plaques und den einzelständigen mukosalen Lymphfollikeln. Hier werden translozierte luminaire Antigene gesammelt und Immunantworten induziert. Das Effektorkompartiment umfasst die intraepithelialen Lymphozyten (CD8-positive T-Zellen und $\gamma\delta$ -Zellen) und die Lymphozyten der Lamina propria (CD4-positive und CD8-positive T-Zellen, Natürliche Killerzellen und B-Zellen). Dort üben die differenzierten Zellen der adaptiven Immunsystems ihre Effektorfunktion aus: zelluläre Immun-Antworten durch intraepitheliala und in der Lamina propria lokalisierte T-Zellen und humorale Reaktionen durch Plasmazellen der Lamina propria.⁵⁰

51

Je nach Qualität und Intensität kann eine mukosale Immunreaktion starke Auswirkungen auf die oben beschriebenen Transport- und Barrierefunktionen der Lamina epithelialis haben.⁴⁰ Umgekehrt können Defekte in der physischen Barriere des Darmepithels durch vermehrten Erreger- und Antigenübertritt Entzündungs- und Immunreaktionen der Mukosa auslösen.³⁴ Es besteht also enge Wechselwirkungen zwischen Epithelfunktion und mukosalem Immunsystem des Darms. Ein Beispiel für eine pathogene wechselseitige Interaktion zwischen mukosaler Immunreaktion und Barrieredefekt des Darmepithels findet sich in der Pathogenese chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Nach aktuellen Vorstellungen führt eine überschießende Immunreaktion auf die residente Flora des Darmlumens zu mukosaler Makrophagen- und T-Zellaktivierung mit konsekutiver Produktion inflammatorischer Zytokine. Diese kompromittieren ihrerseits wiederum die epitheliale Barriere, so dass durch fortgesetzten Übertritt luminaler Antigene der Entzündungsprozess weiter perpetuiert wird.^{16, 52} Die Aktivierung einer mukosalen Inflammation mit konsekutiver Schädigung des Epithels oder seines Schlussleistennetzes spielt aber nicht nur bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine zentrale Rolle. Zahlreiche Enteropathogene entfalten ihre Wirkung ebenfalls über die Aktivierung mukosaler Entzündungskaskaden. prominente Beispiele sind Salmonella Typhimurium, Helicobacter pylori und Clostridium difficile.⁴⁰

Um zu einem umfassendere Verständnis erregerinduzierter Reaktionen der Darmmukosa zu gelangen, ist es daher sinnvoll, den epithel-orientierten Ansatz des Kolon-Modellepithels, durch Untersuchungen zu ergänzen, in denen das Immunsystem der Mukosa Berücksichtigung findet. Zu diesem Zweck haben wir an menschlichen Darmbiopsiepräparaten die Veränderungen des mukosalen Immunsystems wie auch der epithelialen Barrierefunktion. Bei diesen Untersuchungen haben wir uns ganz auf die HIV-Infektion konzentriert. Weil es sich bei der HIV-Infektion um eine primäre Infektion des mukosalen Immunsystems handelt, – während Epithelzellen nicht produktiv infiziert werden –⁵³ belegen die bei der HIV-Infektion auftretenden epithelialen Veränderungen in exemplarischer Weise den großen Einfluss des MALT auf epitheliale Funktionen.

1.2 Die HIV-Infektion ist eine Infektion der intestinalen Mukosa

Der primäre zelluläre Rezeptor für das HIV ist das Glykoprotein CD4.^{54, 55} Die Expression von CD4 auf der Zelloberfläche reicht jedoch für einen erfolgreichen Viruseintritt nicht aus. Nach Bindung an den CD4-Rezeptor ist zusätzlich eine Interaktion mit den Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 notwendig, damit es zur Fusion von Zellmembran und Virushülle mit Eintritt der viralen RNA ins Innere der Zielzelle kommen kann.⁵⁶ Welcher Chemokinrezeptor genutzt wird, hängt vom Rezeptor-Tropismus des Virus ab. Während die frühen Phasen der Infektion in aller Regel durch eine CCR5-trope Viruspopulation gekennzeichnet sind, kommt es mit Fortschreiten des zellulären Immundefekts später häufig zu einem Tropismus-Shift mit Prädominanz einer CXCR4-tropen oder auch einer dual-CCR5/CXCR4-tropen Viruspopulation. Bei der Transmission nutzt das HIV – auch bei CXCR4- oder dual-troper Viruspopulation der Infektionsquelle – durch das Zusammenspiel multipler Mechanismen jedoch ausschließlich CCR5 als Korezeptor.⁵⁷ Unabhängig vom Rezeptortropismus der „Donor-Viren“ liegt daher in der Primärinfektion und in der folgenden frühen Phase der HIV-Infektion eine reine CCR5-trope Viruspopulation vor. Da CCR5 besonders stark auf aktivierten Gedächtnis T-Zellen exprimiert wird, sind aktivierte CD4-positive Gedächtniszellen die wichtigsten primären Zielzellen für das HIV.

Wie bereits erwähnt, enthält die gastrointestinale Mukosa die Mehrzahl der CD4-positiven T-Zellen des Körpers.⁵⁸ Diese mukosalen CD4-Zellen entsprechen dabei phänotypisch mehrheitlich CCR5-positiven, aktivierten Gedächtniszellen und sind somit extrem suszeptibel für HIV.^{59 24, 60, 61} Aus diesem Grund führt - unabhängig von der

Eintrittspforte - die SIV/HIV-Infektion bereits im Rahmen der Primärinfektion zu einem massiven Verlust der CCR5-positiven CD4 Zellen der gastrointestinalen Mukosa.^{21-23, 59, 62,}

⁶³ Quantitative Analysen zeigten, dass während der SIV-Primärinfektion ca. 60% der mukosalen CD4-Zellen mit HIV infiziert werden.⁶⁴ Von diesen werden ca. 80% durch zytopathische oder immunologische Mechanismen eliminiert, was eine signifikante Reduktion des Gesamtpools der CD4-Zellen des Körpers impliziert. Die massive Infektion aktivierter mukosaler CD4-Zellen bedingt darüber hinaus die für die akute HIV-Infektion charakteristische exorbitante Virusreplikation.⁶⁴

Die bei der HIV-Infektion ausgelösten virologischen, immunologischen und entzündlichen Prozesse bleiben nicht ohne Folgen für die Architektur und Funktion der intestinalen Mukosa. Bereits in den frühen 1980er Jahren wurde beobachtet, dass HIV-Infizierte auch in Abwesenheit von intestinalen Sekundärinfektionen häufig unter Diarrhoe und Malabsorptionsproblemen leiden. Für dieses klinisch definierte Syndrom wurde der Terminus „HIV-Enteropathie“ geprägt.⁶⁵ Seit der Charakterisierung der histologischen Veränderungen der Mukosa bei der HIV-Enteropathie, wird der Begriff auch für die HIV-bedingte hyporegeneratorischen Schleimhauttransformation (Verplumpung der Villi mit partieller Villusatrophie bei fehlender Kryptenhyperplasie) verwendet.⁶⁶⁻⁶⁸ Dass die genannten Schleimhautveränderungen auch mit Defekten der mukosalen Barriere- und Transportfunktionen einhergehen, konnte ebenfalls bereits in den 1980er Jahren erstmals gezeigt werden.^{68, 69} Trotz umfangreicher Untersuchungen zu den strukturellen Veränderungen der Darmmukosa bei der HIV-Infektion, konnte aber die Genese der Enteropathie bis jetzt noch nicht sicher geklärt werden.

Die Bedeutung der HIV-induzierten mukosalen Veränderungen geht aber über Diarrhoe und potentielle Resorptions-Störungen weit hinaus. Nach aktuellem Verständnis nehmen die im Rahmen der HIV- Infektion auftretenden Störungen der mukosalen Barrierefunktion einen gravierenden Einfluss auf die natürliche Pathogenese der Erkrankung. Erhöhte Plasmaspiegel bakterieller Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten lassen eine erhöhte bakterielle Translokation aus dem Intestinaltrakt vermuten.³⁰ Als Folge der erhöhten LPS-kommt es zu einer chronischen Immunaktivierung, die als ein zentraler Mechanismus des progredienten Immundefekts bei der HIV-Infektion gilt.³⁰ Unklar war jedoch bisher der Zeitpunkt der Initiierung sowie die auslösenden und perpetuierenden Mechanismen des mukosalen Barriere-defekts bei der HIV- Infektion. Unbekannt war ebenso, inwieweit

mukosale Immunaktivierung, HIV-induzierter Barrieredefekt und HIV-Enteropathie reversibel sind, wenn die Virusreplikation durch eine hochaktive antiretrovirale Therapie supprimiert wird. Ferner waren der mukosalen Immunaktivierung entgegenwirkende immunregulatorische Mechanismen, wie z. B. regulatorische T-Zellen, bei der HIV-Infektion bislang nicht untersucht.

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Auswirkungen mukosaler Infektionen auf Funktion, Struktur und Immunsystem der Darmschleimhaut zu charakterisieren. Entsprechend der heterogenen Funktionalität der gastrointestinalen Mukosa: epitheliale Transport- und Barrierefunktion einerseits und immunologische Funktion unter maßgeblicher Beteiligung des mukosalen Immunsystems andererseits, wurden die Untersuchungen auf zwei Ebenen durchgeführt.

In einem reduktionistischen Ansatz wurden direkte Effekte von enteralen Erregern auf ein isoliertes intestinale Epithel untersucht. Mit diesem Ansatz sollten durch spezifische Erreger bzw. deren Virulenzfaktoren im Epithel induzierte, zu Barrieredefekt, zu Hypersekretion und zu bakteriellen Translokation führende Mechanismen charakterisiert werden. Anhand der Identifikation von Pathomechanismen exemplarischer enteraler Erregern sollte darüber hinaus ein experimentelles Infektionsmodell etabliert werden, mit dessen Hilfe spezifische Effekte von Enteritis infectiosa-Erregern auf die epitheliale Barriere- und Transportfunktion analysiert sowie deren molekularen Mechanismen charakterisiert werden können. Hierfür wurde ein kompartimentierter experimenteller Aufbau gewählt, in dem ein Modellepithel, bestehend aus polarisiert wachsenden Monolayern hochdifferenzierter Kolonozyten (HT-29/B6),⁴⁷ eine trennende Membran zwischen einem apikalen (entsprechend dem Darmlumen) von einem basolateralen (entsprechend dem Interstitium) Kompartiment bildet. Mittels elektrophysiologischen und Tracer-Flux-Experimenten konnten nun Veränderungen der Transport- und/oder Barrierefunktionen des Modellepithels quantitativ erfasst und analysiert werden. Der Einsatz biochemischer, mikroskopischer, immunhistochemischer, mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden erlaubte die weiterführende Analyse von beteiligten (molekularen) Mechanismen und Signaltransduktionswegen. Im Einzelnen wurden mit diesem Modell folgende Fragestellungen untersucht:

1. Verfügt das Modell über eine funktionell aktive und Stimulus-getriggerte, regulierte Chloridsekretion und kann somit zur Analyse Erreger-/Toxin-bedingter Chloridsekretion genutzt werden? Ist das HT-29/B6-Modell ein geeignetes System zur Untersuchung der intestinalen Muzinsekretion? Hat Cholera-toxin (ein prototypisches cAMP-abhängiges bakterielles Toxin) eine direkte Wirkung auch auf die Muzinsekretion von Kolonozyten und, falls ja, über welche Signaltransduktionswege wird der Effekt ausgelöst?
2. Induziert das inflammatorische Zytokin TNF- α am Kolonepithel eine Barriestörung? Ist das HT-29/B6-Modell dazu geeignet, Perturbationen der parazellulären Leitfähigkeit quantitativ abzubilden und kann es somit als geeignetes Modell zur Analyse erregerbedingter Barriere-Störungen des intestinalen Epithels gelten?.
3. Kann mit dem HT-29/B6-Modell ein bis dato unbekannter Pathomechanismus eines enteralen Erregers identifiziert und charakterisiert werden? Spezifisch: Wie kommt es zur Diarrhoe bei der enteralen *Aeromonas*-Infektion? Welche Virulenzfaktoren und welche epithelialen Signaltransduktionswege sind dabei beteiligt?
4. Kann das HT-29/B6-Modell genutzt werden, um die Translokation pathogener *Escherichia coli* über das Epithel zu charakterisieren? Falls ja, wie ist der Translokationsweg und welche bakteriellen Virulenzfaktoren sind dabei beteiligt?

Der bisher beschriebene Ansatz ist auf das isolierte Epithel fokussiert. Einflüsse des lokalen Immunsystems werden – wie im Falle der Untersuchungen zum Effekt von TNF auf die epitheliale Barrierefunktion – durch gezielten *in vitro* Einsatz entsprechender Zytokine betrachtet. Um Aufschluss über infektionsbedingte mukosale Alterationen zu gewinnen, wie sie *in vivo* durch die Interaktion zwischen mukosalem Immunsystem und Epithel entstehen, wurden in einem zweiten experimentellen Ansatz immunologische Veränderungen, Struktur und Epithel-Funktionen an nativen intestinalen Mukosapräparaten untersucht, die bioptisch im Rahmen von Standardendoskopien des oberen Gastrointestinaltrakts gewonnen wurden. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf die HIV-Infektion, die eine der bedeutendsten Infektionen des Menschen

überhaupt darstellt. Da innerhalb der Mukosa ausschließlich Immunzellen, nicht aber Epithelzellen, von HIV produktiv infiziert werden,⁵³ ist die HIV-Infektion sehr gut dazu geeignet, die Auswirkungen von infektionsbedingten Veränderungen des lokalen Immunsystems auf die Epithelfunktion exemplarisch darzustellen. Die Untersuchungen sind somit eine komplementäre Ergänzung zur Analyse epithelialer Effekte am isolierten Darmepithel. Darüber hinaus bestimmen die HIV-induzierten Veränderungen innerhalb der gastrointestinalen Mukosa die Pathogenese der Infektion entscheidend mit. Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

5. Kommt es bereits im Rahmen der primären HIV-Infektion zu einem Immundefekt und, falls ja, welche immunologischen und epithelialen Mechanismen sind beteiligt?
6. Können Mechanismen identifiziert werden, die bei der chronischen HIV-Infektion den intestinalen Barrieredefekt und die HIV-Enteropathie aufrechterhalten und sind Barrieredefekt und Enteropathie unter einer suppressiven antiviralen Therapie reversibel?
7. Besteht eine erhöhte Expression inflammatorischer und/oder regulatorischer Zytokine in der Mukosa HIV-Infizierter?
8. Wie verhält sich die Häufigkeit regulatorischer T-Zellen in der Mukosa und im peripheren Blut HIV-Infizierter sowohl in Bezug auf ihre Flächendichte als auch in Relation zu anderen T-Zell-Subtypen? Wie ist der Einfluss einer suppressiven antiviralen Therapie auf die genannten Parameter?

2 Ergebnisse

2.1 Effekt von Cholera-toxin auf die epitheliale Muzin- und Chloridsekretion

Bei der Cholera kommt es zu einer deutlichen Steigerung der intestinalen Muzinsekretion, die bei den Infizierten zu enteralen Kohlenhydrat- und Proteinverlusten führt und zudem die „Reiswasser-artige“ Konsistenz der Cholera-Stühle erklärt. Zwar konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Stimulation der Muzinsekretion durch Cholera-toxin ausgelöst wird,^{70, 71} unklar blieb aber, ob dieser Effekt direkt an den schleimbildenden Enterozyten und Becherzellen des Epithels oder aber indirekt unter Vermittlung subepithelialer Strukturen, wie etwa von Komponenten des enteralen Nervensystems,⁷² ausgelöst wird. Gegen eine direkte Wirkung von Cholera-toxin auf die epitheliale Muzinsekretion sprach die bis dato geltende Annahme, dass die geregelte Muzinsekretion Ca^{2+} -abhängig erfolgt ohne Beteiligung von cAMP, dem durch Cholera-toxin am Epithel aktivierten second messenger.⁷³

Anhand der Wirkung von Cholera-toxin auf die Muzinsekretion kultivierter, hochdifferenzierter Kolonozyten (HT-29/B6) sollte in den folgenden Untersuchungen zunächst die Frage geklärt werden, ob Cholera-toxin tatsächlich eine direkte Wirkung auf die epitheliale Muzinsekretion ausübt. Das gewählte Modell schien besonders geeignet, weil bekannt war, dass HT-29/B6-Monolayer die Fähigkeit zur aktiven Chlorid- und Muzinsekretion besitzen.⁴⁷ Da Cholera-toxin eine sehr starke Wirkung auf die Muzinsekretion der Monolayer ausübte, galten weitere Analysen den beteiligten Sekretions- und Signaltransduktionsmechanismen. Zusätzlich dienten die gewonnenen Ergebnisse der weiteren Charakterisierung des HT-29/B6-Modells, insbesondere der Frage, inwieweit das Modell Perturbationen der Chlorid- und Muzinsekretion quantitativ abzubilden vermag.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

H.J. Epple, K.M. Kreusel, C. Hanski, J.D. Schulzke, E.O. Riecken, M. Fromm (1997)
Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol.
Pflügers Arch. 433: 638-647

2.2 Induktion eines Barrieredefekts durch TNF- α im HT-29/B6-Modell

Ein geeignetes Modell zur Charakterisierung von Diarrhoemechanismen muss nicht nur auf sekretagoge Stimuli adäquat reagieren, sondern auch eine Quantifizierung von Effekten auf die Durchlässigkeit der Schlussleisten ermöglichen. Um dies zu etablieren, untersuchten wir den Effekt des inflammatorischen Zytokins TNF- α auf Durchlässigkeit der HT-29/B6-Monolayer und auf die Struktur ihrer Schlussleistennetze. TNF- α wurde gewählt, weil dieses Zytokin in vorangegangenen Studien die Permeabilität einiger nicht-intestinaler Zelllinien erhöht hatte.^{74, 75} Ferner kommt es bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei der HIV-Infektion sowohl zu erhöhten TNF- α -Spiegeln⁷⁶⁻⁷⁸ als auch zu einer deutlichen Erhöhung der Durchlässigkeit der Darmmukosa.^{5, 9, 79-81} Eine Beteiligung von TNF- α bei der Diarrhoe (i. S. einer Leckfluxdiarrhoe, siehe Diskussion) im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder bei der HIV-Enteropathie erschien daher nicht unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

**H. Schmitz, M. Fromm, C.J. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H.J. Epple, E.O. Riecken, J.D. Schulzke (1999).
Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. J. Cell Sci. 112: 137-146**

2.3 Mechanismus der Diarrhoe bei der enteralen Aeromonas-Infektion

Um die Frage zu klären, ob es mithilfe des HT-29/B6-Modells tatsächlich möglich ist, bislang unbekannte Pathomechanismen enteraler Infektionen zu identifizieren, wurde in den folgenden Untersuchungen nicht der Effekt einzelner Substanzen oder Toxine untersucht, sondern vielmehr die Auswirkung einer direkten (apikalen) Exposition der Monolayer mit pathogenen Bakterien. Zu diesem Zweck wurden pathogene Aeromonaden, die zuvor von Patienten mit infektiöser Enteritis isoliert worden waren, dem apikalen Kompartiment der Versuchsanordnung zugegeben und mittels elektrophysiologischer Methoden die resultierenden Effekte auf Chloridsekretion und epitheliale Durchlässigkeit untersucht. *Aeromonas* spp. sind zwar etablierte Erreger der infektiösen Enteritis, der Pathomechanismus aber, über welchen die Diarrhoe ausgelöst wird, war unklar. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass pathogene, nicht aber apathogene Aeromonaden an dem Epithel eine aktive Chloridsekretion auslösen. In weitergehenden Untersuchungen analysierten wir die verantwortlichen bakteriellen Faktoren sowie die beteiligten epithelialen Mechanismen.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

H.J. Epple, J. Mankertz, R. Ignatius, O. Liesenfeld, M. Fromm, M. Zeitz, T. Chakraborty, J.D. Schulzke (2004). *Aeromonas hydrophila* β -hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). *Infect. Immun.* 72: 4848-4858

2.4 Bakterielle Translokation durch Hämolysin-induzierte fokale Epitheldefekte

Die Aufrechterhaltung einer physischen Barriere gegen bakterielle Translokation ist eine der wichtigsten Funktionen des Darmepithels. Bei einer ganzen Reihe von schweren Krankheitsbildern wie dem SIRS, der akuten Pankreatitis oder den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besteht sowohl eine abnorme Durchlässigkeit des intestinalen Epithels als auch eine vermehrte bakterielle Translokation.⁸²⁻⁸⁴ Dennoch ist relativ wenig bekannt, über welche Wege eine bakterielle Translokation vonstatten geht und welche epithelialen Mechanismen dabei beteiligt sind. Ausgehend von einem ähnlichen Ansatz wie bei den Untersuchungen zum Diarrhoemechanismus der *Aeromonas*-Infektion, wurde in den folgenden Untersuchungen der Durchtritt von *Escherichia coli*-Stämmen durch HT-29/B6-Monolayer untersucht. Wie bei *Aeromonas* wurde ein Hämolysin als entscheidender Virulenzfaktor identifiziert. Neben der Aufklärung des Wegs der transepithelialen Translokation zeigen diese Untersuchungen, dass das HT-29/B6-Modell auch zur Analyse transepithelialer bakterieller Translokation gut geeignet ist.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

**H. Troeger, J. Richter, L. Beutin, D. Günzel, Dobrindt, H.J. Epple, A. Gitter, M. Zeitz, M. Fromm, J.D. Schulzke (2007).
E. coli alpha-hemolysin induces focal leaks in colonic epithelium – a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell. Microbiol.* 9:2530-2540**

2.5 Intestinale Barriere und mukosale T-Zellen bei der akuten HIV-Infektion

Dass die chronische HIV-Infektion mit einem Barrieredefekt der intestinalen Mukosa einhergeht, ist durch zahlreiche Studien belegt.^{27, 30, 65, 66, 68, 80, 81, 85} Unbekannt war jedoch bislang, in welchem Stadium der Infektion der Barrieredefekt initiiert wird, und welche Mechanismen dabei beteiligt sind. In Anbetracht der bei der akuten HIV-Infektion ablaufenden virologischen und immunologischen Veränderungen in der intestinalen Mukosa, ist es von besonderem Interesse, ob ein Barrieredefekt bereits in dieser frühen Phase der Infektion getriggert wird. Aufgrund ihrer unspezifischen Klinik bleibt die akute HIV-Infektion jedoch meistens unerkannt. Aus diesem Grund wurden die meisten Untersuchungen zur Frühphase der Infektion am Primatenmodell durchgeführt.

Zwischen Januar 2002 und Dezember 2007 konnten wir in unserer Klinik neun Patienten mit akuter HIV-Infektion (zum Zeitpunkt der Endoskopie waren 7 von 9 Westernblot-negativ, und die restlichen 3 im Stadium der beginnenden Serokonversion) identifizieren und acht dieser Patienten in eine Studie zu den Veränderungen von T-Zell-Subpopulationen und Barrierefunktion der intestinalen Mukosa einschließen. Dabei wurden den Patienten im Rahmen einer Endoskopie des oberen Gastrointestinaltrakts tiefe Duodenalbiopsien entnommen und dann mittels Immunohistochemie, Immunofluoreszenz, Durchflusszytometrie und Impedanzspektroskopie mukosale T-Zell-Subpopulationen sowie epitheliale Parameter der Barrierefunktion analysiert.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

H.J. Epple, K. Allers, H. Tröger, A. Kühl, U. Erben, M. Fromm, M. Zeitz, C. Loddenkemper, J.D. Schulzke, and T. Schneider (2010)
Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. Gastroenterology 139: 1289-300

2.6 Mechanismen des HIV-induzierten Barrieredefekts

Die unbehandelte HIV-Infektion führt zu einer abnormen Durchlässigkeit des Darmepithels und zu einer histologisch und funktionell definierten Enteropathie. Unklar war bislang, ob HIV-induzierter Barrieredefekt und HIV-Enteropathie reversibel sind, wenn die Virusreplikation durch eine hochaktive antiretrovirale Therapie supprimiert wird. Unbekannt sind ferner die Mechanismen des HIV-induzierten Barrieredefekts und der HIV-Enteropathie. Diese Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit durch elektrophysiologische, molekularbiologische, histologische und immunologische Analysen von endoskopisch gewonnenen Darmbiopsaten chronisch HIV-Infizierter untersucht. Die Ergebnisse belegen in mehrfacher Weise die Wechselwirkungen zwischen mukosaler Immunaktivierung und Struktur und Barriere-Funktion der Mukosa. Sie zeigen ferner, dass Barrieredefekt und Zottenatrophie unter einer suppressiven antiretroviralen Therapie reversibel sind.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

**H.J. Epple, T. Schneider, H. Troeger, D. Kunkel, K. Allers, V. Moos, M. Amasheh, C. Loddenkemper, M. Fromm, M. Zeitz, and J.D. Schulzke (2009).
Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. Gut 58: 220-227**

2.7 Erhöhte Zytokinexpression in der Kolonmukosa von HIV-Infizierten

Nicht nur unsere eigene Arbeit (siehe 2.6) sondern auch andere Untersuchungen zeigen, dass in der chronischen HIV-Infektion eine mukosale Zytokinaktivierung zum HIV-induzierten Barrieredefekt beiträgt.^{77, 86, 87} Zum Ausmaß der mukosalen Zytokinproduktion bei der HIV-Infektion liegen aber kontroverse Daten vor.^{29, 86, 88-91}

Da die bestehende Diskrepanz u. a. auch durch vorhandene bzw. supprimierte Virusreplikation erklärt werden könnte, wurden in der folgenden Studie in Kolonbiopsien unbehandelter HIV-infizierter Patienten die mRNA-Expression inflammatorischer und regulatorischer Zytokine untersucht und mit derjenigen von HIV-negativen Kontrollen bzw. behandelten HIV-Infizierten verglichen.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

H. Schulbin, H. Bode, H. Stocker, W. Schmidt, T. Zippel, C. Loddenkemper, E. Engelmann, H.J. Epple, K. Arastéh, M. Zeitz, and R. Ullrich (2008). Cytokine expression in the colonic mucosa of HIV-infected individuals before and during nine months of antiretroviral therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 3377-84

2.8 Zunahme regulatorischer T-Zellen in der Dünndarmmukosa von HIV-Infizierten

Wie unsere Ergebnisse belegen, kann eine überschießende mukosale Immunaktivierung zu erheblichen Schädigungen der Mukosa führen. Aus diesem Grund unterliegt die mukosale Immunreaktion verschiedenen Regelmechanismen, die eine unkontrollierte Immunaktivierung verhindern sollen. Als wichtige Gegenspieler der Immunaktivierung wurden in der letzten Dekade regulatorische T-Zellen identifiziert.^{92, 93} ⁹⁴ Phänotypisch und funktionell können verschiedene Typen regulatorischer T Zellen unterschieden werden. Am besten untersucht sind so genannte natürliche regulatorische T-Zellen, die durch Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie des Transkriptionsfaktors FoxP3 phänotypisch charakterisiert werden können.

Natürliche regulatorische T-Zellen sind dazu in der Lage, die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion sowohl von CD4 als auch von CD8 T Zellen zu hemmen.^{93, 95, 96} Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung selbst-reaktiver T-Zellen⁹³ aber auch in der Kontrolle der Immunantwort bei chronischen Infektionen.^{93, 95, 96} Bezüglich ihrer Rolle bei der HIV-Infektion existierten widersprüchliche Ansichten. Ergebnisse von Studien deuteten einerseits darauf hin, dass natürliche regulatorische T Zellen der chronischen Immunaktivierung und somit der Krankheitsprogression entgegenwirken.^{97, 98} Andererseits wurden sie mit der Insuffizienz der HIV-spezifischen Immunantwort in Verbindung gebracht.⁸⁸⁻⁹¹

Bisher gab es jedoch kaum Daten zur Verteilung von regulatorischen T-Zellen in lymphatischem Gewebe, dem Ort der HIV-Replikation. Insbesondere war die Häufigkeit regulatorischer T-Zellen im Gastrointestinaltrakt – einem Schlüssel-Kompartiment der HIV-Immunpathogenese – unbekannt. Da die natürlichen regulatorischen T Zellen einen Großteil ihrer Wirkung über direkten Zell-Zell-Kontakt ausüben, sind derartige Daten unverzichtbar, um zu einer wirklichen Einschätzung ihrer Rolle in der HIV-Infektion zu kommen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Häufigkeit natürlicher (CD25-positiver, FoxP3-positiver) regulatorischer T-Zellen in der Duodenalmukosa und im peripheren Blut von unbehandelten HIV-infizierten Patienten bestimmt und mit derjenigen von suppressiv behandelten HIV-infizierten Patienten und HIV-negativen Kontrollen verglichen.

Die Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert:

H.J. Epple*, C. Loddenkemper*, D. Kunkel*, H. Troeger, J. Maul, V. Moos, E. Berg, R. Ullrich, J.D. Schulzke, H. Stein, R. Duchmann, M. Zeitz, T. Schneider (2006).

(* equally contributing)

Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. Blood 108: 3072-3078

3 Diskussion

Die Symptomatologie mukosaler Infektionen des Intestinums wird im Wesentlichen durch Funktionsstörungen des Darmepithels bestimmt und äußert sich meist als Diarrhoe. Unabhängig davon, ob die primäre Zielstruktur der Infektion in der Epithelschicht selbst oder im Subepithel lokalisiert ist, sind es letztlich molekulare und/oder zelluläre Veränderungen im Epithel, die zur Diarrhoe führen. Die Bedeutung mukosaler Infektionen der intestinalen Schleimhaut erschöpft sich aber nicht allein in ihrem Vermögen, Diarrhoe auszulösen. So spielt die Translokation von Bakterien über eine kompromitierte epitheliale Barriere bei einer Vielzahl von teils schweren systemischen Entzündungszuständen eine große Rolle.⁸²⁻⁸⁴ Und schließlich führt die HIV-Infektion – die mit einiger Berechtigung primär als mukosale Infektion betrachtet werden kann – zu gravierenden Veränderungen innerhalb des Mukosa-assozierte Immunsystem des Darms mit konsekutiven Auswirkungen auf die Barrierefunktion des Epithels, deren Störung ihrerseits einen signifikanten Einfluss auf die Pathogenese und Progression der HIV-Infektion ausübt.³¹

In Anbetracht dieser die komplexen Funktionen der intestinalen Mukosa widerspiegelnden, unterschiedlichen Qualitäten mukosaler Infektionen, ist es notwendig, die Auswirkungen derartiger Infektionen auf mehreren Ebenen zu betrachten. Sinnvoll erscheint, bei zur Diarrhoe führender Infektion zunächst den vorliegenden Diarrhoemechanismus auf epithelialer Ebene zu klären. Denn aus der an Pathomechanismen orientierten Zuordnung ergeben sich unmittelbare Hinweise sowohl auf die beteiligten epithelialen Signaltransduktionsmechanismen als auch bezüglich der Frage, ob die beobachteten epithelialen Effekte am Epithel selbst oder indirekt, unter Vermittlung subepithelialer Strukturen vermittelt werden.

Zur Charakterisierung epithelialer Veränderungen bei enteralen Infektionen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellkultur-basiertes Infektionsmodell etabliert, mit dem erregerbedingte Effekte auf Chlorid- und Muzinsekretion sowie auf die epitheliale Permeabilität mit hoher Auflösung detektiert und quantifiziert werden können. Zudem ermöglicht das Modell die Aufklärung von Signaltransduktionswegen, qualitative und quantitative Analysen der Schlußleistungszusammensetzung und die Bestimmung der epithelialen Apoptoserate. Wie in den durchgeführten Untersuchungen deutlich wurde, ist dieses Modell gut dazu geeignet, gemäß der oben prinzipiell skizzierten Vorgehensweise

epitheliale Schädigungsmuster bei mukosalen Infektionen abzubilden und somit einer weiter gehenden Analyse zugänglich zu machen. Hierbei lassen sich charakteristische Muster der Epithelschädigung voneinander abgrenzen.

3.1 Epitheliale Schädigungsmuster bei mukosalen Infektionen

Grundsätzlich kommt es zur Diarrhoe, wenn die physiologische Bilanz zwischen Resorption und Sekretion von Elektrolyten und Wasser zugunsten der Sekretion verschoben ist, sodass es zur Zunahme von Stuhlwassergehalt und –volumen kommt. Dabei können folgende pathophysiologischen Mechanismen unterschieden werden:⁹⁹

- Motilitätsbedingte Diarrhoe: Zu kurze Resorptionszeit durch beschleunigter Darmpassage des Chymus (z. B. bei Hyperthyreose);
- Osmotische Diarrhoe: Osmotische Wirkung primär nicht-resorbierbarer Substanzen (z. B. Diät-Zucker);
- Malabsorptive Diarrhoe: Pathologisch verminderte aktive Solut- und Wasserresorption;
- Sekretorische Diarrhoe: Pathologisch gesteigerte aktive Solut- und Wassersekretion;
- Leckflux-Diarrhoe: Pathologisch gesteigerte parazelluläre Solut- und Wassersekretion.

Die Pathomechanismen der infektiösen Diarrhoe fallen nahezu ausschließlich in die Kategorien der Sekretorischen und der Leckflux-Diarrhoe. Einige Formen der infektiösen Diarrhoe enthalten zwar auch eine malabsorptive Teilkomponente, diese tritt von ihrer Bedeutung für die Gesamtbilanz der transepithelialen Volumenverschiebung gegenüber den beiden erstgenannten jedoch meist in den Hintergrund.⁴⁰ Eine korrekte Zuordnung zu den o. g. Diarrhoemechanismen ist ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der Pathogenese der jeweiligen Infektion, weil sie eine Einengung der in Frage kommenden vom jeweiligen Erreger attackierten Zielstrukturen erlaubt. Beispielsweise liegt der sekretorischen Diarrhoe meist eine Überstimulation der aktiven Chloridsekretion zugrunde mit passiver, d. h. dem osmotischen Gradienten folgender Sekretion von Wasser.

Auf zellulärer Ebene wird die Chloridsekretion über mehrere second messenger-Systeme reguliert, die die Aktivität der apikalen Chloridkanäle verändert.

Ein klassisches Beispiel für die sekretorische Diarrhoe liegt bei der Cholera vor. Nach Aufnahme der Erreger (*Vibrio cholerae*) und einer variablen Inkubationszeit von Stunden bis Tagen kommt es zur massiven Diarrhoe mit Flüssigkeitsverlusten von bis zu 20 l/d. Schleimbeimengungen bedingen dabei die typische „Reiswasser-artige“ Konsistenz der Cholera-Stühle. Der wichtigste Virulenzfaktor der Vibrionen ist das so genannte Cholera-toxin, das durch starke Stimulation der aktiven Chloridsekretion die schwere sekretorische Diarrhoe verursacht.⁴² Die Sequenz der zur pathologischen Chloridsekretion führenden Ereignisse ist im Detail aufgeklärt. Nach Bindung des Toxins an das Gangliosid GM₁ auf der apikalen Enterozytenmembran und nachfolgender Translokation katalysiert die aktive Toxin-Untereinheit eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des stimulatorischen heterotrimeren G-Proteins mit der Folge einer permanenten Stimulation der Adenylatzyklase.⁴² Das im Übermaß gebildete cAMP stimuliert dann direkt die Öffnung eines cAMP-abhängigen apikalen Chloridkanals (CFTR).^{43, 100}

Die Kenntnis dieser Mechanismen machten wir uns bei der Aufklärung der Wirkung von Cholera-toxin auf die Muzinsekretion zunutze. Wie sich in unseren Untersuchungen zeigte, induziert Cholera-toxin an den HT-29/B6-Zellen neben der elektrogenen Chloridsekretion auch die Muzinsekretion. Anders als die Ca²⁺-abhängige transitorische Muzinsekretion, persistierte die durch Cholera-toxin induzierte Muzinsekretion über den gesamten Inkubationszeitraum. Simultan beobachteten wir eine anhaltenden Erhöhung des intrazellulären cAMP. Ferner konnte durch einen Hemmer der Proteinkinase A die Cholera-toxin-induzierte Sekretion inhibiert werden. Diese Ergebnisse sprechen stark dafür, dass Cholera-toxin über Erhöhung von cAMP nicht nur die epitheliale Chlorid-, sondern auch auf die epitheliale Muzinsekretion stimuliert. Vor unserer Untersuchung war man noch davon ausgegangen, dass die Muzinsekretion im Intestinum im Wesentlichen über die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ reguliert wird.⁷³ Unseren Ergebnissen zufolge triggert Ca²⁺ die pulsatile Freisetzung präformierter Muzine aus Speicherganula, während cAMP die konstitutive Freisetzung neu synthetisierter Mucine reguliert. Darüber hinaus belegen die erzielten Ergebnisse, dass das HT-29/B6-Modell zur Quantifizierung von sekretagen Stimuli auf die intestinale Chlorid- und Muzinsekretion genutzt werden kann.¹⁰¹

Gleichartige mechanistische Überlegungen wie für die Chlorid- und Muzinsekretion können auch für die Leckfluxdiarrhoe angewendet werden. Allerdings sind die potentiellen zellulären Ziele für mikrobielle Virulenzfaktoren deutlich diverser als bei der sekretorischen Diarrhoe. Zur Bewertung des HT-29/B6-Modells als experimentelles System für enterale Infektionen war es daher zunächst wichtig zu klären, inwieweit das Modell Modulationen der parazellulären Durchlässigkeit überhaupt quantitativ erfassen kann. Tatsächlich fand sich nach Behandlung der HT-29/B6-Zellen mit TNF- α eine 80%ige Reduktion des transpeithelialen Widerstands, die in Abwesenheit einer aktiven Sekretion und Intaktheit des Monolayers durch Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit verursacht sein musste.¹¹ Somit können im HT-29/B6-Modell die wichtigsten Pathomechanismen der infektiösen Diarrhoe – aktive Chloridsekretion und erhöhte parazelluläre Leitfähigkeit – ausgelöst und quantifiziert werden. Ferner konnte erstmals gezeigt werden, dass das inflammatorische Zytokin TNF- α durch Erhöhung der epithelialen Permeabilität eine Leckfluxdiarrhoe verursachen kann.¹¹

Nach Identifizierung einer erregerbedingten Diarrhoe als Leckfluxdiarrhoe ist zur weiteren mechanistischen Zuordnung die Frage zu klären, ob die Leckfluxdiarrhoe durch Zelluntergang von Enterozyten oder durch Modifikation der Schlussleisten hervorgerufen wird. Im ersten Fall ist das Spektrum der zu Nekrose oder vermehrter Apoptose führenden pathogenen Stimuli zu berücksichtigen. Im zweiten Fall gilt es herauszufinden, welche am Aufbau der Schlussleisten beteiligten strukturellen oder regulatorischen Komponenten von der Interaktion zwischen Wirtszelle und mikrobiellen Virulenzfaktoren betroffen sind. Im Falle von TNF- α fand sich elektronenmikroskopisch eine Verschmälerung des Schlußleistennetzes,¹¹ sodass, wie Folgestudien aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt,^{5, 102} eine Wirkung von TNF- α auf Expression und Zusammensetzung der tight junction Proteine gezeigt werden konnte. In einer späteren Untersuchung wurde zudem gefunden, dass TNF- α auch epitheliale Apoptosen induziert, sodass das Zytokin die parazelluläre Durchlässigkeit über zwei Mechanismen – Steigerung von Schlußleistenpermeabilität und epithelialer Apoptoserate - erhöht.³ Inzwischen wird die Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion durch TNF- α als ein an der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zentrale beteiligter Mechanismus gesehen.^{4, 34} Und, wie unsere eigenen Untersuchungen zeigen: auch bei der Genese des HIV-induzierten mukosalen Barrieredefekts spielt dieses inflammatorische Zytokin vermutlich eine wichtige Rolle.¹⁰³

Nachdem sich gezeigt hatte, dass das HT-29/B6-Modell die wichtigsten Pathomechanismen der Erreger-induzierten Diarrhoe abzubilden vermag, wurde das experimentelle System dazu benutzt, den bis dato unbekannt Pathomechanismus der Aeromonas-induzierten Diarrhoe aufzuklären. Um die in vivo vorliegende Situation zu modellieren, wurden pathogene Aeromonaden dem apikalen (=luminalen) Kompartiment der Versuchsanordnung zugegeben. Durch diesen Ansatz können sowohl Effekte, die durch eine Interaktion der Bakterien mit den Epithelzellen hervorgerufen werden (wie etwa Adhäsion und/oder Injektion von bakteriellen Proteinen über einen Typ III-Sekretionsmechanismus) wie auch solche, die durch bakterielle Exotoxine verursacht werden erfasst werden. Tatsächlich kam es durch apikale Inkubation der Erreger mit dem Epithel zu einer aktiven Sekretion von Chlorid, sodass die durch Aeromonas ausgelöste Diarrhoe dem Typus der sekretorischen Diarrhoe zugeordnet werden konnte.¹⁰⁴ Weitergehende Analysen erbrachten jedoch deutliche Unterschiede zum oben dargelegten Diarrhoemechanismus bei der Cholera. Als auslösender Virulenzfaktor der Aeromonas-induzierten Diarrhoe konnte nämlich ein β -Hämolyysin ausgemacht werden, das - vermutlich durch Einbau von Poren in die apikale Zellmembran der Kolonozyten - eine Chloridsekretion hervorruft, die nicht durch cAMP oder Ca^{2+} sondern zumindest partiell durch die Proteinkinase C reguliert wird.¹⁰⁴ Obwohl aus den Ergebnissen epidemiologischer Untersuchungen bereits vermutet worden war, dass das Aeromonas-Hämolyysin ein wichtiger Virulenzfaktor des Erregers sein könnte,^{105, 106} wurde durch unsere Untersuchung erstmals der Pathomechanismus identifiziert, über den das Hämolyysin am Epithel eine Sekretion auslöst.

Den für die Aeromonas-Studie skizzierten experimentellen Grundaufbau erweiternd, wurde in einer nachfolgenden Studie nach apikaler Zugabe verschiedener Escherichia coli-Stämme die Translokation ins basolaterale Kompartiment quantifiziert. Von den getesteten Stämmen zeigte sich nur bei einem Stamm eine signifikante Translokation. In eingehenden Analysen wurde erneut ein Hämolyysin als der für die bakterielle Translokation entscheidende Faktor identifiziert. In der Konfokalmikroskopie wurden kleine Defekte innerhalb der epithelialen Monolayer als Durchtrittsstelle gefunden. Derartige Defekte wurden nur durch Hämolyysin-sezernierende Stämme, nicht aber durch deren Hämolyysin-defekte Knock-Out-Varianten induziert.¹⁰⁷ Zusammenfassend belegen die epithelialen Reaktionen auf pathogene Aeromonaden und auf Hämolyysin-exprimierende E. coli, dass bakterielle Hämolyisine als wichtige enteropathogene Virulenzfaktoren in Betracht gezogen werden müssen.

3.2 HIV-Infektion, Barrierefunktion und mukosale Immunaktivierung

Bei vielen Infektionen werden epitheliale Veränderungen primär nicht am Epithel selbst, sondern indirekt, d. h. durch Vermittlung subepithelialer Strukturen ausgelöst.⁴⁰ Durch die enge Verzahnung zwischen immunologischen und funktionellen Aspekten der Mukosa kommt hierbei dem lokalen Immunsystem des Darmes eine herausragende Bedeutung zu. Besonders deutlich werden diese Zusammenhänge bei der HIV-Infektion, die mit massiven Veränderungen im mukosalen Immunsystem einhergeht, ohne dass die Epithelzellen produktiv infiziert sind. Dennoch kommt es durch die HIV-induzierten Veränderungen im Mukosa-assoziierten Immunsystem des Darmes zu signifikanten Veränderungen epithelialer Barrierefunktionen, die wiederum entscheidend auf die Immunpathogenese der HIV-Infektion zurückwirken.

In mehreren Studien wurden bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten und auch bei Primaten mit progressiver SIV-Infektion erhöhte Serumkonzentrationen von Lipopolysacchariden oder anderen Bestandteilen gramnegativer Bakterien gefunden.^{30, 108-110} Es zeigte sich zudem eine Assoziation der Serumspiegel dieser Antigene mit Markern einer systemischen Immunaktivierung.^{30, 108, 109} Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass die HIV-Infektion einen Defekt der intestinalen Mukosabarriere induziert, die eine Translokation bakterieller Antigene aus dem Darmlumen zur Folge hat.^{30, 31, 108-110} Die vermehrte systemische Exposition gegenüber bakteriellen Antigenen gilt inzwischen als einer der wichtigsten Mechanismen der chronischen Immunaktivierung,^{30, 31} die wiederum als treibende Kraft der progressiven Immundepletion bei der HIV Infektion angesehen wird.¹¹¹

In Übereinstimmung mit diesem Modell fand sich bereits in älteren Studien Hinweise für eine abnorme Durchlässigkeit des Darmepithels bei der HIV-Infektion.^{80, 112} Da dieser funktionelle Defekt auch unabhängig von opportunistischen Infektionen oder anderen Sekundärerkrankungen der HIV-Infektion beobachtet wurde, wird er offenbar durch die HIV-Infektion selbst, bzw. die mit ihr einhergehenden immunologischen Veränderungen induziert.^{80, 112} Naheliegend war die Vermutung, dass die bei der HIV-Infektion regelhaft und früh auftretende Depletion mukosaler CD4 Zellen über eine gestörte Pathogenkontrolle zu dem Defekt der intestinalen Mukosabarriere führt.³¹ Tatsächlich interpretierten die meisten Autoren die erhöht gefundenen LPS-Spiegel als

Surrogat einer durch mukosalen CD4 T Zellverlust gestörten intestinalen Barriere.^{30, 31, 108-110}

Direkte Untersuchungen der Barrierefunktion des intestinalen Epithels bei der HIV-Infektion gab es aber bislang nur wenige. Die meisten diesbezüglichen Studien bedienen sich vielmehr einer indirekten Analyse, in der nach oraler Gabe einer Testlösung verschiedener teils resorbierbarer, teils nicht-resorbierbarer Saccharide deren Wiederfindungsrate im Urin als Maß der intestinalen Resorptionsleistung bzw. Permeabilität genommen wird.¹¹³⁻¹¹⁶ Mithilfe derartiger in vivo Tests sind zwar pauschale Aussagen über die Resorptionsleistung bzw. die Permeabilität des gesamten Dünndarms möglich, für eine detaillierte Analyse der beteiligten immunologischen und epithelialen Mechanismen sind sie jedoch ungeeignet. Ein weiterer Nachteil dieser in vivo Methode ist die große Zahl potentieller Störgrößen: intestinale Transitzeit, Blutfluss im Splanchnikusgebiet, enterale Bakterienflora und Nierenfunktion u.a.m. Ex vivo durchgeführte elektrophysiologische Analysen von endoskopisch gewonnenen Dünndarmproben, wie sie in den vorliegenden Arbeiten durchgeführt wurden, erlauben hingegen sowohl eine präzise Quantifizierung der Barrierefunktion mit definiertem Flächenbezug als auch eingehende immunologische und mechanistische Untersuchungen.

Daher verwendeten wir eine elektrophysiologische ex vivo Versuchsanordnung, um die Barrierefunktion des Dünndarmepithels bei acht Patienten mit früher akuter HIV-Infektion (Endoskopie bei 6 von 8 Patienten noch vor Serokonversion) zu untersuchen. Mittels Impedanzspektroskopie und Mannitol-Fluxen konnten wir dabei erstmals zeigen, dass der HIV-induzierte Barrieredefekt bereits in diesem frühen Stadium der Infektion voll ausgebildet ist. Interessanterweise fanden wir bei diesen Patienten eine *erhöhte* Zahl mukosaler CD4 T Zellen in scheinbarem Widerspruch zu früheren Studien, die einen Verlust mukosaler CD4 T Zellen während der retroviralen Primärinfektion berichteten.^{22, 63, 117} Eine kritische Durchsicht der publizierten Daten zeigte aber, dass im SIV-Modell durchaus ein Anstieg mukosaler CD4 T Zellen in der frühen Primärinfektion beobachtet wurde, der allerdings bei durchflusszytometrischer Quantifizierung durch einen gleichzeitig ablaufenden Anstieg mukosaler CD8 T Zellen teilweise verschleiert wurde.^{21, 59, 64, 118, 119} Ein Vergleich unserer Daten mit Ergebnissen früherer Studien zu mukosalen CD4 T Zellen bei der akuten HIV-Infektion ist aber schwer zu ziehen, weil in früheren Studien sowohl Patienten in der Serokonversion, Patienten mit kompletter Serokonversion und Patienten mit schon länger (Monate) zurückliegender Serokonversion

eingeschlossenen wurden. Da bei der akuten HIV-Infektion in rascher zeitlicher Abfolge dramatische Veränderungen im systemischen und auch mukosalen Immunsystem ablaufen, ist aber insbesondere der klar definierte Bezug auf das aktuelle Stadium der Primärinfektion zum Zeitpunkt der Untersuchung von entscheidender Bedeutung.^{22, 63, 117, 120} Wir vermuten daher, dass die Zunahme mukosaler CD4 Zellen vermutlich nur bei Biopsientnahme in der frühen akuten Primärinfektion (vor / innerhalb der Serokonversion, vor Erreichen des Viral Set Point) zu erfassen ist, während kurze Zeit später der CD4 Zellverlust aus der Mukosa apparent wird.

Phänotypisch entsprachen die mukosalen CD4 T Zellen bei unseren Patienten mit akuter HIV-Infektion mehrheitlich aktivierten Effektor-Memory-Zellen, den „idealen“ Zielzellen für das HIV. Die Abwesenheit von Proliferationszeichen sprach dafür, dass diese aktivierten CD4 T Zellen in der frühen Primärinfektion in die Mukosa einwandern, wo sie dann in der späteren Phase der Primärinfektion depletiert werden. Ebenso fanden wir bei den Patienten mit akuter HIV-Infektion eine Zunahme mukosaler Perforin-positiver CD8 T Zellen. Auch dieser Befund war neu, da – wie von uns und auch von anderen gezeigt wurde - in der chronischen Infektion die mukosale Perforin-Expression verloren geht.^{121, 122} Die Dichte der Perforin-positiven CD8 T Zellen korrelierte dabei mit einer Zunahme von Apoptosen in der Lamina epithelialis. Die Erhöhung der epithelialen Apoptoserate ist somit das pathophysiologische Korrelat, „die epitheliale Endstrecke“, der in der akuten HIV-Infektion ausgelösten Barrierestörung. Zusammenfassend führt nach unseren Daten die akute HIV-Infektion zu einer Einwanderung von aktivierten CD4- und CD8-positiven T Zellen in die intestinale Mukosa. Bereits in diesem frühen Stadium der Infektion kommt es durch Perforin-induzierte epitheliale Apoptosen zur Ausbildung eines mukosalen Barrieredefekts.

Obwohl der beschriebene Ablauf die Initiierung des HIV-induzierten Barrieredefekts zu erklären vermag, bietet er doch keine Erklärung für die Perpetuierung des Barrieredefekts in der chronischen Infektion, da - wie bereits erwähnt - die Perforin-Expression der mukosalen CD8 T Zellen im Verlauf der Infektion verloren geht. Mittels Impedanz-Spektroskopie und Tracerfluxexperimenten demonstrierten Stockmann et al. bereits in den 1990er Jahren bei der chronischen HIV-Infektion eine definierte Barrierestörung des Dünndarms.^{80, 123} Diesen Befund konnten wir an einer Gruppe unbehandelter chronisch HIV-Infizierter bestätigen. Zusätzlich fanden wir bei diesen Patienten als strukturelles Korrelat der Barrierestörung eine erhöhte epitheliale

Apoptoserate sowie permeabilitätssteigernde Veränderungen der tight junction-Proteinzusammensetzung. Obwohl die mukosalen CD4 T Zellen bei den unbehandelten Patienten erwartungsgemäß erniedrigt waren, fand sich – als Ausdruck einer mukosalen Immunaktivierung – eine erhöhte Zahl mukosaler CD8 T Zellen wie auch eine gesteigerte mukosale Produktion inflammatorischer Zytokine. Der Barrieredefekt, die Veränderungen der tight junction Proteine, die epitheliale Apoptoserate und die gesteigerte mukosale Zytokinproduktion waren unter einer suppressiven antiretroviralen Therapie reversibel. Diese Studie zeigte erstmals, dass sich der HIV-induzierte Barrieredefekt der intestinalen Mukosa unter einer suppressiven antiviralen Therapie zurückbilden kann. Ferner definierte sie zentrale Komponenten des Mechanismus, mit welchem der Barrieredefekt bei der chronischen Infektion aufrecht erhalten wird. Anders als bei der akuten Infektion sind es hier mukosale Zytokine, die eine entscheidende Rolle spielen, und neben der epithelialen Apoptose treten auch Permeabilitäts-steigernde Veränderungen an den tight junctions auf.

Dass inflammatorische Zytokine wie TNF- über die genannten epithelialen Veränderungen einen Barrieredefekt der Darmmukosa unterhalten können, ist durch zahlreiche Studien gut belegt.^{5, 6, 9-11, 27, 124, 125} Ob aber die mukosale Produktion von Zytokinen bei der HIV-Infektion tatsächlich hochreguliert ist, war bisher kontrovers beurteilt worden. So fand sich in mononukleären Zellen, die aus dem Kolon HIV-infizierter Patienten isoliert worden waren keine erhöhte Produktion von Zytokinen.^{126, 127} In unserer eigenen Studie hingegen war – in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen -^{29, 86, 87, 128}, bei HIV-Infizierten die mRNA Expression in der Kolonmukosa für eine ganze Reihe von Zytokinen erhöht.¹²⁹ Da die aus der Mukosa isolierten Zellen aus dem Netzwerk des lokalen Immunsystems herausgelöst wurden, könnte die fehlenden Stimulation durch andere Immunzellen eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz sein. In Einklang mit dieser Überlegung fanden wir eine gesteigerte Zytokinsekretion von Mukosabiopsien, in denen sich die Zytokinproduzenten in sozusagen in ihrer physiologischen Umgebung befanden.

Zusammenfassend ist die Aktivierung des mukosalen Immunsystems der entscheidende auslösende Faktor für den Barrieredefekt der Darmmukosa bei der HIV-Infektion. In der frühen Phase der Primärinfektion ist die mukosale Immunaktivierung durch zelluläre Komponenten (aktivierte CD4 und CD8 T Zellen) und die zytotoxische Wirkung von CD8 T Zellen vermittelt. Ferner findet sich, wie in einer SIV-Studie gezeigt wurde, eine Hochregulierung von Genen, die mit einer inflammatorischen Reaktion

assoziiert sind, bei gleichzeitiger verminderter Expression von Genen, die zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere beitragen.¹¹⁷ Bei der chronischen Infektion steht die mukosale Zytokinaktivierung im Vordergrund mit gesteigerter mukosaler Expression einer ganzen Reihe von proinflammatorischen Zytokinen und β -Chemokinen^{25, 29, 129}, wobei die Infiltration der intestinalen Lamina propria mit CD8-Zellen auch bei fortschreitendem Immundefekt persistiert.^{25, 26, 57, 130} Strukturelle Korrelate der epithelialen Barriestörung sind veränderte Zusammensetzung der Schlußleistennetze bei der chronischen und gesteigerte epitheliale Apoptoserate bei der akuten und chronischen HIV-Infektion.

Nach aktuellen Forschungsergebnissen ist die Immunaktivierung aber nicht nur Ursache, sondern auch Folge der HIV-induzierten Barriestörung. Die bei Barrieredefekt pathologisch gesteigerte Translokation bakterieller Antigene aus dem Darmlumen befördert nämlich nicht nur die mukosale, sondern auch die systemische Immunaktivierung.³¹ Interessanterweise waren bei der SIV-Infektion von Rhesusaffen (rhesus macaques), die ein der HIV-Infektion vergleichbaren Krankheitsverlauf mit dem Endstadium der erworbenen Immunschwäche aufweisen, ebenfalls erhöhte LPS-Spiegel und eine damit assoziierte Immunaktivierung nachzuweisen. Dies war aber nicht der Fall bei der nicht-pathogenen SIV-Infektion der Rußmangabens (sooty mangabeys) und Grünen Meerkatzen (African green monkeys), bei denen trotz produktiver retroviraler Infektion weder bakterielle Translokationsphänomene noch Zeichen der Immunaktivierung oder Immundepletion gefunden werden.³⁰ Eine weitere aktuelle Primaten-Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen erhöhter Darmpermeabilität, epithelialen Apoptosen, Serum LPS-Spiegeln und Krankheitsprogression.¹³¹ Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass allein die produktive retrovirale Infektion nicht ausreicht, um einen progressiven Immundefekt hervorzurufen. Die zum Immundefekt führenden retroviralen Infektionen sind vielmehr durch eine systemische Immunaktivierung charakterisiert und diese wird zu einem guten Teil durch Translokation bakterieller Antigene über einen Barrieredefekt des Darmepithels unterhalten.^{30, 31, 132}

Aus der beschriebenen wechselseitigen Förderung von Barrieredefekt und mukosaler / systemischer Immunaktivierung ergibt sich die Frage nach Mechanismen, die einer Eskalation dieses positiven Wechselkreises entgegen wirken. In diesem Zusammenhang ist eine Subpopulation der CD4-positiven T-Zellen von Interesse, die so genannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Wie in den letzten Jahren gezeigt werden

konnte, üben T_{reg} eine dämpfende, regulierende Wirkung auf andere T-Zellen aus und spielen dadurch eine große Rolle in der Verhinderung von Immunreaktionen auf Nahrungsbestandteile.¹³³ Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung deuten ferner darauf hin, dass eine verminderte Gegenregulation durch eine zu geringe Zahl mukosaler T_{reg} zur Unterhaltung des Entzündungsprozesses bei diesen Patienten beiträgt.¹³⁴ Zudem korrelierte eine erhöhte Frequenz von T_{reg} im peripheren Blut HIV-Infizierter mit einem besseren Immunstatus und auch Verlauf der Erkrankung,^{90, 91, 135} sodass eine gegen die Immunaktivierung gerichtete Wirkung der T_{reg} auch bei der HIV-Infektion möglich erscheint.

Zur Rolle regulatorischer T-Zellen im mukosalen Immunsystem lagen dagegen keine Daten vor. Darüber hinaus waren die Auswirkung einer suppressiven hochaktiven antiretrovirale Therapie auf die die Häufigkeit mukosaler regulatorischer T-Zellen unbekannt. In unserer Studie wurden erstmalig Daten zur mukosalen Häufigkeit von regulatorischen T-Zellen bei der HIV-Infektion vorgelegt. Bei unbehandelten Patienten fand sich eine dramatischen Zunahme der regulatorischen T-Zellen in der intestinalen Mukosa, die sich nach effektiver Suppression der HIV-Replikation auf das Maß nicht-HIV-Infizierter zurückbildete.¹³⁶ Da sich die mukosale Immunaktivierung und der Barrieredefekt nach Suppression der HIV-Replikation durch eine hochaktive antiretrovirale Therapie ebenfalls normalisierten, könnte die erhöhte Zahl regulatorischer T-Zellen bei unbehandelten HIV-Patienten Ausdruck einer bei gestörter Barriere und vermehrter Antigen-Translokation einsetzenden immunologischen Gegenregulation sein, deren Ziel es ist, die mukosale Immunaktivierung und die mit ihr einhergehende epitheliale Schädigung und deren ungünstige Auswirkungen zu begrenzen.

Insgesamt belegen unsere Untersuchungen zu den mukosalen Auswirkungen der HIV-Infektion eindrücklich die vielfältigen Interaktionen zwischen mukosalem Immunsystem und epithelialen Barrierfunktionen. Mukosaler Immunaktivierung und epithelialer Barrieredefekt besitzen dabei ein Potential zu ungünstiger Wechselwirkung, indem die mukosale Immunaktivierung einen Barrieredefekt induziert und unterhält, der Barrieredefekt über vermehrte Translokation bakterieller Bestandteile aber wiederum aggravierend auf die mukosale Immunaktivierung zurückwirkt. Um einer Entgleisung dieser sich gegenseitig verstärkenden Prozesse entgegen zu wirken, sind regulierende Mechanismen von großer Bedeutung, wie sie in Form der regulatorischen T-Zellen in der Mukosa aktiv sind. Zusätzlich zeigt sich in den Untersuchungen wie komplexe

immunologische Abläufe über „gemeinsame Endstrecken“ in charakteristische strukturell und molekular Barrierefunktionsstörungen münden.

4 Zusammenfassung

Die intestinale Mukosa erfüllt komplexe und divergente Funktionen. Auf der einen Seite stehen gerichtete Transportvorgänge von Nahrungsbestandteilen, Elektrolyten und Wasser. Auf der anderen Seite nimmt die intestinale Mukosa durch ein spezialisiertes mukosales Immunsystem vielfältige immunologische Funktionen wahr. Für beides ist die Barrierefunktion des intestinalen Epithels von entscheidender Bedeutung. Als Diffusionsbarriere bildet sie eine notwendige Voraussetzung aller gerichteten transepithelialen Transportvorgänge, als mechanisch-immunologische Barriere verhindert sie das unkontrollierte Eindringen von Antigenen aus dem Darmlumen.

Aufgrund einer stetigen Exposition gegenüber einer großen Zahl von Antigenen und (potentiell) pathogenen Keimen ist die intestinale Mukosa ein häufiger Manifestationsort von Infektionen. Dabei können die primären molekularen Zielstrukturen einer Infektion direkt im Epithel oder aber in tieferen Schichten der Mukosa wie etwas dem Mukosa-assoziierten Immunsystem oder dem enteralen Nervensystem lokalisiert sein. Unabhängig vom primären Ansatzpunkt kommt es aufgrund der engen Verzahnung der mukosalen Funktionen in der Folge mukosaler Infektionen meist zu Störungen der epithelialen Transport- und Barrierefunktionen. Vor dem Hintergrund der weiten Verbreitung und Häufigkeit intestinaler Infektionen wie auch ihrer möglichen Auswirkungen auf systemische Krankheitsprozesse besteht ein großes wissenschaftliches Interesse an der Aufklärung von Pathomechanismen mukosaler Infektionen.

In der vorliegenden Arbeit wird an Untersuchungen zu exemplarischen mukosalen Infektionen ein Beitrag zu einem vertieften Verständnis der Mechanismen mukosaler Infektionen geleistet. Methodisch erfolgten die Untersuchungen auf zwei Ebenen.

Studien zu epithelialen Mechanismen wurden an einem isolierten Modellepithel (HT-29/B6) durchgeführt. Das aus einem Monolayer hochdifferenzierter Kolonozyten bestehende Epithel wurde dabei als trennende Membran zwischen einem apikalen (entsprechend dem Darmlumen) und einem basolateralen (entsprechend dem Interstitium) Flüssigkeitskompartiment eingebracht. Nach Perturbation des Systems z. B. durch Exposition gegen Bakterien wurden mittels elektrophysiologischer Methoden und Tracerfluxmessungen die resultierenden Veränderungen der Transport- und Barrierefunktionen untersucht. Die Mechanismen der gefundenen funktionellen

Veränderungen wurden dann durch weiterführende biochemische, molekularbiologische, morphologische und mikrobiologische Methoden analysiert.

Untersuchungen zu den mukosalen Auswirkungen der HIV-Infektion erfolgten dagegen ex vivo an endoskopisch gewonnener nativer Dünndarmmukosa. Diese Präparate enthalten neben dem Epithel auch die Lamina propria inklusive der in ihr vorhandenen Immunzellen. Da das HI Virus zwar Zellen des mukosalen Immunsystems, nicht aber Enterozyten infiziert, beleuchten diese Untersuchungen in besonderer Weise die Auswirkungen von infektionsbedingten pathologischen Veränderungen des mukosalen Immunsystems auf Architektur und Funktion der Schleimhaut. Sie sind daher eine komplementäre Ergänzung zum vorgenannten Epithel-fokussierten Ansatz. Darüber hinaus wird derzeit angenommen, dass Störungen der mukosalen Barrierefunktion eine zentrale Bedeutung für den charakteristischen progressiven Immundefekt der HIV-Infektion besitzen. Unklar waren jedoch bislang die Mechanismen des mukosalen Barrieredefekts, der Zeitpunkt seiner Initiierung und seine Rückbildungsfähigkeit unter einer hochaktiven antiretroviralen Therapie. Aus dem engen Zusammenhang zwischen mukosalem Barrieredefekt und Immunaktivierung bei der HIV-Infektion ergibt sich ferner die Frage nach immunregulatorischen Mechanismen, z. B. durch regulatorischen T-Zellen, die der HIV-induzierten mukosalen Immunaktivierung entgegenwirken. Um diese Fragen zu klären haben wir in mehreren Studien an Duodenalbiopsien von Patienten mit akuter oder mit chronischer HIV-Infektion mittels Impedanzspektroskopie und Tracerfluxmessungen die Barrierefunktion des Dünndarmepithels charakterisiert und mittels molekularbiologischen, immunologischen und morphologischen Analysen die beteiligten immunologischen und epithelialen Veränderungen näher charakterisiert.

Die wichtigsten Resultate der Untersuchungen am isolierten Modellepithel (HT-29/B6):

- Es wurde erstmals gezeigt, dass Choleratoxin am Kolonepithel eine direkte, cAMP-abhängige stimulierende Wirkung auf die enterale Muzinsekretion ausübt.
- Erstmals wurde experimentell bestätigt, dass TNF- α zu einer Barriestörung des intestinalen Epithels führt. Diese Barriestörung wird u.a. durch eine geänderte Zusammensetzung der Schlußleisten verursacht.

- Das HT-29/B6-Modell kann sowohl Perturbationen der Chlorid- und Muzinsekretion, als auch solche der parazellulären Leitfähigkeit quantitativ abbilden. Es ist somit sehr gut geeignet, die wichtigsten Erreger-bedingten Diarrhoemechanismen zu analysieren.
- Die Diarrhoe bei der enteralen Aeromonasinfektion wird durch Induktion einer aktiven Chloridsekretion ausgelöst. Wesentlicher Virulenzfaktor ist hierbei ein von pathogenen Aeromonaden sezerniertes β -Hämolysin. Die Chloridsekretion kommt vermutlich durch Insertion der Hämolysinpore in die apikale Zellmembran der Enterozyten zustande. Erstmals wird ein derartiger Pathomechanismus für ein bakterielles Hämolysin beschrieben.
- Die Translokation von extraintestinal pathogenen Escherichia coli durch das Modellpithel wurde analysiert und im Detail beschrieben. Wir beobachteten einen bisher noch nicht beschriebenen Translokationsmechanismus: die durch ein bakterielles Hämolysin vermittelten Entstehung kleiner Epitheldefekte („focal leaks“)
- Die zur Aeromonas-Infektion und zur Translokation von Escherichia coli erzielten Ergebnisse belegen, dass das HT-29/B6-Modell gut geeignet ist, um bis dato unbekannte Pathomechanismen enteraler Erregers zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die wichtigsten Resultate der Untersuchungen an der Duodenalmukosa von HIV-Infizierten ex vivo:

- An einer klinisch sehr gut charakterisierten, homogenen Gruppe von Patienten wurde erstmals gezeigt, dass der HIV-induzierte Barrieredefekt der Darmmukosa bereits in der Frühphase der akuten HIV-Infektion (vor der Serokonversion zum Zeitpunkt der „Peak“-Virämie) ausgebildet ist. In dieser Phase der Infektion fand sich eine Infiltration der Darmmukosa mit aktivierten CD4 und CD8 T Zellen. Als strukturelles Korrelat der Barriestörung wurde eine erhöhte Anzahl epithelialer Apoptosen identifiziert, die wiederum mit der mukosalen Zunahme Perforin-positiver CD8 T Zellen korrelierte.

- Erstmals wurde gezeigt, dass der HIV-induzierter intestinale Barriere defekt unter einer suppressiven antiviralen Therapie komplett reversibel ist. Der Barriere defekt bei der chronischen Infektion ist Ausdruck sowohl einer gesteigerten epithelialen Apoptoserate als auch einer veränderten Zusammensetzung der Schlußleistenproteine. Beide Veränderungen werden durch eine erhöhte mukosale Produktion inflammatorischer Zytokine unterhalten. Barriere defekt, erhöhte Apoptoserate und veränderte Schlußleistenzusammensetzung sind unter einer hochaktiven antiretroviralen Therapie reversibel. Da nach derzeitigem Verständnis die intestinale Barriere störung zur systemischen Immunaktivierung bei der HIV-Infektion beiträgt, hat seine therapie-induzierbare Rückbildung eine potentiell erhebliche Bedeutung für die Indikationsstellung zum Beginn einer antiretroviralen Therapie.
- In der Darmschleimhaut von HIV-infizierten Patienten besteht eine erhöhte Expression und Sekretion inflammatorischer Zytokine. Enteropathie und Barriere defekt werden vermutlich durch die erhöhte mukosale Produktion von Zytokinen unterhalten.
- Die HIV-Infektion induziert eine mukosale Immunaktivierung, die in der akuten Infektion durch Infiltration mit Perforin-positiven CD8 T Zellen, in der chronischen Phase eher durch Zytokinaktivierung charakterisiert ist. Die mukosale Immunaktivierung bei der HIV-Infektion ist der zentrale Mechanismus der epithelialen Barriere störung. Diese wiederum führt – im Sinne eines Circulus vitiosus – über vermehrte Translokation bakterieller Antigene ihrerseits zu einer Perpetuierung der mukosalen und systemischen Immunaktivierung
- Erstmalig werden Daten zur mukosalen Häufigkeit von regulatorischen T-Zellen bei der HIV-Infektion vorgelegt. Bei unbehandelten HIV-Patienten kommt es zu einer dramatischen Zunahme von regulatorischen T-Zellen in der intestinalen Mukosa nicht aber im peripheren Blut. Nach effektiver Suppression der HIV-Replikation durch eine hochaktive antiretrovirale Therapie normalisiert sich die Anzahl der mukosalen regulatorischen T-Zellen. Die Zunahme regulatorischer T-Zellen in der Darmmukosa von

HIV-Infizierten kann somit als Gegenregulation der HIV-induzierten mukosalen Immunaktivierung interpretiert werden.

5 Literatur

1. Mullin JM, Agostino N, Rendon-Huerta E, Thornton JJ. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today* 2005;10:395-408.
2. Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol* 2001;535:541-52.
3. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 2000;14:1749-53.
4. Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:288-99.
5. Zeissig S, Bojarski C, Buegel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 2004;53:1295-302.
6. Adams RB, Planchon SM, Roche JK. IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol* 1993;150:2356-63.
7. Bode H, Schmitz H, Fromm M, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD. IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon. *Cytokine* 1998;10:457-65.
8. Grotjohann I, Schmitz H, Fromm M, Schulzke JD. Effect of TNF alpha and IFN gamma on epithelial barrier function in rat rectum in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:282-6.
9. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Buegel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550-64.
10. Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989;83:724-7.
11. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 1):137-46.
12. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407.
13. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol* 2008;43:1-17.
14. Kraus TA, Mayer L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:692-6.
15. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365-75.
16. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999;44:812-8.

17. Johansson EW, Wardlaw, T., et al. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. The United Nation's Children Fund (UNICEF) and World Health Organization (WHO), 2009.
18. Cohen ML. The epidemiology of diarrheal disease in the United States. *Infect Dis Clin North Am* 1988;2:557-70.
19. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991;325:252-64.
20. Fackler OT, Schafer M, Schmidt W, Zippel T, Heise W, Schneider T, Zeitz M, Riecken EO, Mueller-Lantsch N, Ullrich R. HIV-1 p24 but not proviral load is increased in the intestinal mucosa compared with the peripheral blood in HIV-infected patients. *Aids* 1998;12:139-46.
21. Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, Stolte N, Stahl-Hennig C, Kaup FJ, Stallmach A, Zeitz M. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology* 1999;116:1115-23.
22. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:749-59.
23. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:761-70.
24. Lapenta C, Boirivant M, Marini M, Santini SM, Logozzi M, Viora M, Belardelli F, Fais S. Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 1999;29:1202-8.
25. Nilsson J, Kinloch-de-Loes S, Granath A, Sonnerborg A, Goh LE, Andersson J. Early immune activation in gut-associated and peripheral lymphoid tissue during acute HIV infection. *Aids* 2007;21:565-74.
26. Olsson J, Poles M, Spetz AL, Elliott J, Hultin L, Giorgi J, Andersson J, Anton P. Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines. *J Infect Dis* 2000;182:1625-35.
27. Schmitz H, Rokos K, Florian P, Gitter AH, Fromm M, Scholz P, Ullrich R, Zeitz M, Pauli G, Schulzke JD. Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *Aids* 2002;16:983-91.
28. Kotler DP, Shimada T, Snow G, Winson G, Chen W, Zhao M, Inada Y, Clayton F. Effect of combination antiretroviral therapy upon rectal mucosal HIV RNA burden and mononuclear cell apoptosis. *Aids* 1998;12:597-604.
29. McGowan I, Elliott J, Fuerst M, Taing P, Boscardin J, Poles M, Anton P. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37:1228-36.
30. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006.
31. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006;7:235-9.

32. Köhne GT ST, Zeitz M. Special features of the intestinal lymphocytic system. *Ballierre's Clinical Gastroenterology*, 1996:427-442.
33. Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaakso E. Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev* 1993;73:823-57.
34. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:799-809.
35. Fromm M. Transport in Membranen und Epithelien. In: Schmidt RF, Lang, F., ed. *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage ed. Heidelberg: Springer, 2007:41-54.
36. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:588-600.
37. Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions: closing in on the seal. *Curr Biol* 1999;9:R922-4.
38. Tsukita S, Furuse M. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:129-35.
39. Sears CL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1129-34.
40. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003;52:439-51.
41. Sousa S, Lecuit M, Cossart P. Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:489-98.
42. Gill DM. Mechanism of action of cholera toxin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1977;8:85-118.
43. de Jonge HR. Cyclic nucleotide-dependent phosphorylation of intestinal epithelium proteins. *Nature* 1976;262:591-3.
44. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;81:1-44.
45. Wu S, Lim KC, Huang J, Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14979-84.
46. Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 2001;69:1329-36.
47. Kreuzel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 1991;261:C574-82.
48. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2001;2:1004-9.
49. Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 2001;1:59-67.
50. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005;6:551-7.
51. Hein WR. Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;236:1-15.
52. Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease--an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1139-49.
53. Meng G, Wei X, Wu X, Sellers MT, Decker JM, Moldoveanu Z, Orenstein JM, Graham MF, Kappes JC, Mestecky J, Shaw GM, Smith PD. Primary intestinal

- epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 2002;8:150-6.
54. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-7.
 55. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;312:767-8.
 56. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol* 1997;9:551-62.
 57. Margolis L, Shattock R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol* 2006;4:312-7.
 58. Lefrancois L, Puddington L. Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo. *Annu Rev Immunol* 2006;24:681-704.
 59. Veazey RS, Tham IC, Mansfield KG, DeMaria M, Forand AE, Shvetz DE, Chalifoux LV, Sehgal PK, Lackner AA. Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol* 2000;74:57-64.
 60. Poles MA, Elliott J, Taing P, Anton PA, Chen IS. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2001;75:8390-9.
 61. Anton PA, Elliott J, Poles MA, McGowan IM, Matud J, Hultin LE, Grovit-Ferbas K, Mackay CR, Chen ISY, Giorgi JV. Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *Aids* 2000;14:1761-5.
 62. Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE, Lackner AA. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2000;74:11001-7.
 63. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003;77:11708-17.
 64. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005;434:1093-7.
 65. Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1984;101:421-8.
 66. Zeitz M, Ullrich R, Schneider T, Kewenig S, Hohloch K, Riecken EO. HIV/SIV enteropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:139-48.
 67. Batman PA, Kapembwa MS, Miller AR, Sedgwick PM, Lucas S, Sewankambo NK, Serwadda D, Pudney J, Moody A, Harris JR, Griffin GE. HIV enteropathy: comparative morphometry of the jejunal mucosa of HIV infected patients resident in the United Kingdom and Uganda. *Gut* 1998;43:350-5.
 68. Ullrich R, Zeitz M, Heise W, L'Age M, Hoffken G, Riecken EO. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence for HIV-induced enteropathy. *Ann Intern Med* 1989;111:15-21.
 69. Heise C, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S. Primary acute simian immunodeficiency virus infection of intestinal lymphoid tissue is associated with gastrointestinal dysfunction. *J Infect Dis* 1994;169:1116-20.
 70. Sherr HP, Mertens RB. Cholera toxin-induced glycoprotein secretion in rabbit small intestine. *Gastroenterology* 1979;77:18-25.

71. Steinberg SE, Banwell JG, Yardley JH, Keusch GT, Hendrix TR. Comparison of secretory and histological effects of shigella and cholera enterotoxins in rabbit jejunum. *Gastroenterology* 1975;68:309-17.
72. Moore BA, Sharkey KA, Mantle M. Neural mediation of cholera toxin-induced mucin secretion in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1993;265:G1050-6.
73. Neutra MR, O'Malley LJ, Specian RD. Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol* 1982;242:G380-7.
74. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology* 1993;25:1-9.
75. Mullin JM, Laughlin KV, Marano CW, Russo LM, Soler AP. Modulation of tumor necrosis factor-induced increase in renal (LLC-PK1) transepithelial permeability. *Am J Physiol* 1992;263:F915-24.
76. Braegger CP, MacDonald TT. Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann Allergy* 1994;72:135-41.
77. Kotler DP, Reka S, Clayton F. Intestinal mucosal inflammation associated with human immunodeficiency virus infection. *Dig Dis Sci* 1993;38:1119-27.
78. Lahdevirta J, Maury CP, Teppo AM, Repo H. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988;85:289-91.
79. Bjarnason I, Sharpstone DR, Francis N, Marker A, Taylor C, Barrett M, Macpherson A, Baldwin C, Menzies IS, Crane RC, Smith T, Pozniak A, Gazzard BG. Intestinal inflammation, ileal structure and function in HIV. *Aids* 1996;10:1385-91.
80. Stockmann M, Fromm M, Schmitz H, Schmidt W, Riecken EO, Schulzke JD. Duodenal biopsies of HIV-infected patients with diarrhoea exhibit epithelial barrier defects but no active secretion. *Aids* 1998;12:43-51.
81. Stockmann M, Schmitz H, Fromm M, Schmidt W, Pauli G, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD. Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:293-303.
82. Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KK. Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg* 1993;165:46-50; discussion 51-2.
83. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998;42:29-35.
84. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 1994;107:643-9.
85. Zeitz M, Ullrich R, Schneider T, Kewenig S, Riecken E. Mucosal immunodeficiency in HIV/SIV infection. *Pathobiology* 1998;66:151-7.
86. Reka S, Garro ML, Kotler DP. Variation in the expression of human immunodeficiency virus RNA and cytokine mRNA in rectal mucosa during the progression of infection. *Lymphokine Cytokine Res* 1994;13:391-8.
87. Reka S, Kotler DP. Detection and localization of HIV RNA and TNF mRNA in rectal biopsies from patients with AIDS. *Cytokine* 1993;5:305-8.
88. Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004;78:2454-9.
89. Carbonneil C, Donkova-Petrini V, Aouba A, Weiss L. Defective dendritic cell function in HIV-infected patients receiving effective highly active antiretroviral therapy: neutralization of IL-10 production and depletion of CD4+CD25+ T cells restore high levels of HIV-specific CD4+ T cell responses induced by dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J Immunol* 2004;172:7832-40.

90. Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, McGlaughlin M, Jackson R, Ziegler SF, Fauci AS. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 2004;200:331-43.
91. Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, Levy Y. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood* 2004;104:3249-56.
92. Rouse BT, Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *J Immunol* 2004;173:2211-5.
93. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
94. Jiao Y, Fu J, Xing S, Fu B, Zhang Z, Shi M, Wang X, Zhang J, Jin L, Kang F, Wu H, Wang FS. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8(+) T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology* 2008.
95. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-22.
96. Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 2003;252:92-8; discussion 98-105, 106-14.
97. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 2005;174:4407-14.
98. Kornfeld C, Ploquin MJ, Pandrea I, Faye A, Onanga R, Apetrei C, Poaty-Mavoungou V, Rouquet P, Estaquier J, Mortara L, Desoutter JF, Butor C, Le Grand R, Roques P, Simon F, Barre-Sinoussi F, Diop OM, Muller-Trutwin MC. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest* 2005;115:1082-91.
99. Fromm M. Störungen der Verdauung und des epithelialen Transports. In: Hierholzer K, Schmidt, R.F., ed. *Pathophysiologie des Menschen*. Weinheim: Chapman & Hall, 1994:6.28-6.38.
100. Cassel D, Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2669-73.
101. Epple HJ, Kreusel KM, Hanski C, Schulzke JD, Riecken EO, Fromm M. Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch* 1997;433:638-47.
102. Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schoneberg T, Fromm M, Schulzke JD. Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:657-66.
103. Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, Amasheh M, Loddenkemper C, Fromm M, Zeitz M, Schulzke JD. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut* 2008.

104. Epple HJ, Mankertz J, Ignatius R, Liesenfeld O, Fromm M, Zeitz M, Chakraborty T, Schulzke JD. *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin induces active chloride secretion in colon epithelial cells (HT-29/B6). *Infect Immun* 2004;72:4848-58.
105. Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:397-410.
106. Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect* 1999;1:1129-37.
107. Troeger H, Richter JF, Beutin L, Gunzel D, Dobrindt U, Epple HJ, Gitter AH, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell Microbiol* 2007;9:2530-40.
108. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 2008;3:e2516.
109. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis* 2009;199:1177-85.
110. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, Morace G, Gori A, Monforte AD. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *Aids* 2008;22:2035-8.
111. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *Journal of Infectious Diseases* 1999;179:859-70.
112. Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, Amasheh M, Loddenkemper C, Fromm M, Zeitz M, Schulzke JD. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut* 2009;58:220-7.
113. Lim SG, Menzies IS, Lee CA, Johnson MA, Pounder RE. Intestinal permeability and function in patients infected with human immunodeficiency virus. A comparison with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:573-80.
114. Keating J, Bjarnason I, Somasundaram S, Macpherson A, Francis N, Price AB, Sharpstone D, Smithson J, Menzies IS, Gazzard BG. Intestinal absorptive capacity, intestinal permeability and jejunal histology in HIV and their relation to diarrhoea. *Gut* 1995;37:623-9.
115. Obinna FC, Cook G, Beale T, Dave S, Cunningham D, Fleming SC, Claydon E, Harris JW, Kapembwa MS. Comparative assessment of small intestinal and colonic permeability in HIV-infected homosexual men. *Aids* 1995;9:1009-16.
116. Sharpstone D, Neild P, Crane R, Taylor C, Hodgson C, Sherwood R, Gazzard B, Bjarnason I. Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea. *Gut* 1999;45:70-6.
117. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, Dandekar S. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J Virol* 2008;82:538-45.

118. Eberly MD, Kader M, Hassan W, Rogers KA, Zhou J, Mueller YM, Mattapallil MJ, Piatak M, Jr., Lifson JD, Katsikis PD, Roederer M, Villinger F, Mattapallil JJ. Increased IL-15 production is associated with higher susceptibility of memory CD4 T cells to simian immunodeficiency virus during acute infection. *J Immunol* 2009;182:1439-48.
119. Lay MD, Petravic J, Gordon SN, Engram J, Silvestri G, Davenport MP. Is the gut the major source of virus in early simian immunodeficiency virus infection? *J Virol* 2009;83:7517-23.
120. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, Flamm J, Wegelin J, Prindiville T, Dandekar S. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol* 2006;80:8236-47.
121. Quigley MF, Abel K, Zuber B, Miller CJ, Sandberg JK, Shacklett BL. Perforin expression in the gastrointestinal mucosa is limited to acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2006;80:3083-7.
122. Shacklett BL, Cox CA, Quigley MF, Kreis C, Stollman NH, Jacobson MA, Andersson J, Sandberg JK, Nixon DF. Abundant expression of granzyme A, but not perforin, in granules of CD8+ T cells in GALT: implications for immune control of HIV-1 infection. *J Immunol* 2004;173:641-8.
123. Stockmann M, Schmitz H, Fromm M, Schmidt W, Rokos K, Pauli G, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD. The mechanism of diarrhea in HIV is based on an impaired epithelial barrier function that could be induced by a specific cytokine pattern. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:267-70.
124. Fish SM, Proujansky R, Reenstra WW. Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut* 1999;45:191-8.
125. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *The Journal of Immunology* 2003;171:6164-6172.
126. Steffen M, Reinecker HC, Petersen J, Doehn C, Pfluger I, Voss A, Raedler A. Differences in cytokine secretion by intestinal mononuclear cells, peripheral blood monocytes and alveolar macrophages from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 1993;91:30-6.
127. Snijders F, van Deventer SJ, Bartelsman JF, den Otter P, Jansen J, Mevissen ML, van Gool T, Danner SA, Reiss P. Diarrhoea in HIV-infected patients: no evidence of cytokine-mediated inflammation in jejunal mucosa. *Aids* 1995;9:367-73.
128. McGowan I, Radford-Smith G, Jewell DP. Cytokine gene expression in HIV-infected intestinal mucosa. *Aids* 1994;8:1569-75.
129. Schulbin H, Bode H, Stocker H, Schmidt W, Zippel T, Loddenkemper C, Engelmann E, Epple HJ, Arasteh K, Zeitz M, Ullrich R. Cytokine expression in the colonic mucosa of HIV-infected individuals before and during nine months of antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008.
130. Andersson J, Kinloch S, Sonnerborg A, Nilsson J, Fehniger TE, Spetz AL, Behbahani H, Goh LE, McDade H, Gazzard B, Stellbrink H, Cooper D, Perrin L. Low levels of perforin expression in CD8+ T lymphocyte granules in lymphoid tissue during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2002;185:1355-8.
131. Klatt NR, Harris LD, Vinton CL, Sung H, Briant JA, Tabb B, Morcock D, McGinty JW, Lifson JD, Lafont BA, Martin MA, Levine AD, Estes JD, Brenchley JM. Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with

- increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. *Mucosal Immunol* 2010;3:387-98.
132. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *Aids* 2008;22:439-46.
 133. Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1322-32.
 134. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868-78.
 135. Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita E, Shirasaka T, Sano H. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *Aids* 2005;19:879-86.
 136. Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke JD, Stein H, Duchmann R, Zeitz M, Schneider T. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood* 2006;108:3072-8.

6 Danksagung

Bei allen Menschen, die mich über die Jahre meiner bisherigen akademischen Tätigkeit unterstützt und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Martin Zeitz sehr herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit, für seine große sachliche Diskussionsbereitschaft und für seine fortwährende Unterstützung und Förderung sowohl in klinischer als auch in wissenschaftlicher Hinsicht.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. E. O. Riecken, der als mein erster klinischer Lehrer und Chef einen prägenden Eindruck bei mir hinterlassen und mir in schwieriger Situation mit großer Selbstverständlichkeit geholfen hat.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Prof. Jörg-Dieter Schulzke und Prof. Dr. Michael Fromm, die mir bei allen wissenschaftlichen und beruflichen Schwierigkeiten stets hilfreich und freundschaftlich zur Seite gestanden haben.

Mein herzlicher Dank gilt all meinen Kooperationspartnern, namentlich genannt sei hier an erster Stelle Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider, aber auch Dr. Kristina Allers und Prof. Dr. C. Loddenkemper, für unsere fruchtbare, anregende und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schulzke, des Instituts für Klinische Physiologie und der Zentralen Endoskopie, insbesondere bei Anja Fromm und bei Detlef Sorgenfrei, ohne deren vielfältige Unterstützung viele Untersuchungen nicht hätten realisiert werden können.

Schließlich danke ich von Herzen meiner Frau Bettina und meinen Kindern, Moritz und Hannah, ohne deren Rückhalt diese Arbeit nicht entstanden wäre.

7 Eidesstattliche Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe,
- ich die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben habe und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den

(Dr. med. Hans-Jörg Epple)