

# 1. Einleitung

## 1. 1. Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV)

### 1.1.1. Epidemiologie

Die Erforschung und Bekämpfung der Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) ist eine der größten Herausforderungen an die moderne Medizin:

Rund 40 Millionen Menschen waren 2006 weltweit mit HIV infiziert.

Die Anzahl der Neuinfektionen wurde auf 4,3 Millionen geschätzt, und circa drei Millionen Menschen starben an den Folgen der erworbenen Immunschwäche.

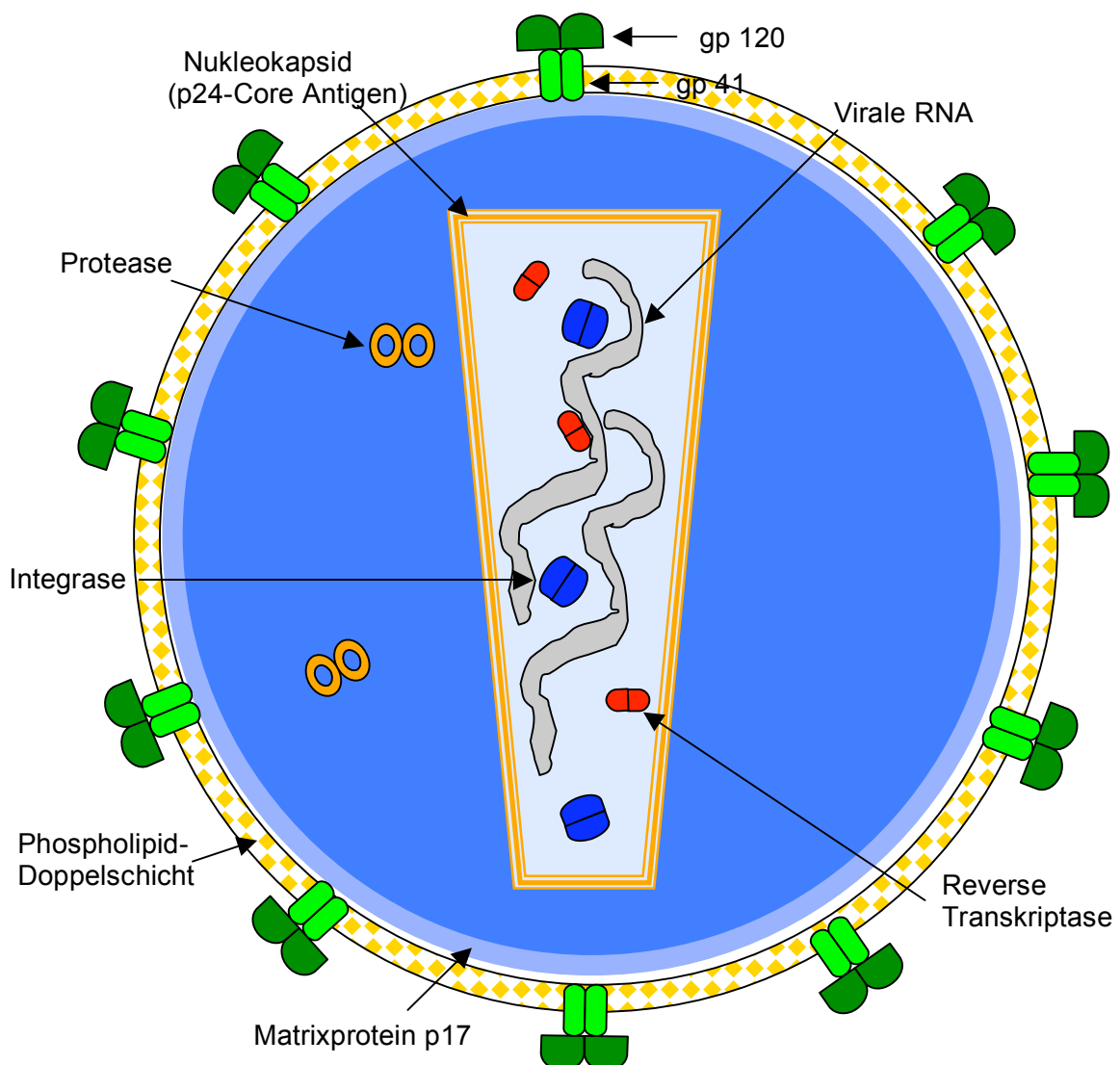
Über 25 Millionen Menschen sind seit Beginn der Pandemie an den Folgen der HIV-Infektion gestorben<sup>1</sup>.

Seit der Charakterisierung des HI-Virus im Jahre 1983<sup>2 3</sup> hat dank intensiver internationaler Forschungsarbeiten ein enormer Erkenntniszuwachs stattgefunden, doch bleiben zahlreiche Probleme ungelöst: Zwar hat die HIV-Infektion durch Entwicklung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) in den industrialisierten Ländern den Status einer chronischen Krankheit erlangt, jedoch erhalten in den am stärksten betroffenen Ländern Afrikas südlich der Sahara nur weniger als ein Viertel aller therapiebedürftigen HIV-infizierten Menschen Zugang zu einer antiretroviralen Therapie<sup>4</sup>. Das Ziel der „3 by 5“ Initiative von WHO und UNAIDS, Ende des Jahres 2005 drei Millionen Menschen in den ärmsten Regionen der Welt mit antiretroviralen Medikamenten zu versorgen, wurde nicht erreicht. Eine Eradikation des Virus ist bislang noch immer nicht möglich und auch die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes gegen HIV erweist sich als schwierig<sup>5-7</sup>.

### 1.1.2. Klassifikation und Morphologie des HI-Virus

Das Humane Immundefizienz Virus ist ein Retrovirus. Es gehört zur Unterfamilie der Lentiviren. Derzeit sind zwei Typen von HIV bekannt: HIV-1 und HIV-2. HIV-2 findet sich im wesentlichen endemisch in Westafrika, wohingegen das virulentere HIV-1 für den Großteil der Pandemie verantwortlich ist. Man geht heute davon aus, daß sich das Humane Immundefizienz Virus durch Mutationen aus Immundefizienz-Viren anderer Primatenspezies entwickelt hat<sup>8</sup>.

HIV-1 verfügt über zwei Kopien eines RNA-Genoms. Die zwei einzelnen Ribonukleinsäure (RNA)-Stränge sind von einem Nukleokapsid umgeben (Abb.1). Das Nukleokapsid wird auch als p24-Core-Antigen bezeichnet. Es wird seinerseits von einer Phospholipiddoppelschicht umhüllt. Der Phospholipiddoppelschicht sitzen 72 sogenannte Spikes auf, welche aus dem Glykoprotein (gp)120 gebildet werden. Gp120 ist durch ein weiteres Glykoprotein, gp41, transmembranär in der Lipidmembran verankert. Der Komplex aus gp120 und gp41, die nichtkovalent miteinander verbunden sind, wird als gp160 bezeichnet. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von circa 100 nm.



**Abb. 1** : Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Das virale Genom besteht aus neun Genen - drei Strukturgenen (*pol*, *env* und *gag*) und sechs regulatorischen Genen (*nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat* und *rev*). Das *pol*-Gen kodiert für die viralen Enzyme (Reverse Transkriptase, Protease und Integrase), *gag* („group antigen“) kodiert für das Nukleokapsid und *env* für die Virushülle<sup>8 9</sup>

### 1.1.3. Der Replikationszyklus von HIV

Zur Infektion einer Zielzelle benötigt HIV zweierlei Arten von Rezeptoren: CD4 als primären Rezeptor, sowie einen Chemokinrezeptor als Corezeptor. Die zwei wichtigsten derzeit bekannten Chemokin-Corezeptoren von HIV sind CCR5 und CXCR4.

CD4 wurde 1984 als primärer Rezeptor von HIV-1, HIV-2 und SIV (simian immunodeficiency virus) identifiziert<sup>10 11</sup>. Das CD4-Antigen ist ein Glykoprotein von rund 60 kDa Molekulargewicht. CD4 findet sich auf der Zelloberfläche von einem Teil der T-Lymphozyten, auf T-Vorläuferzellen in Knochenmark und Thymus, auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen im ZNS<sup>9</sup>. Natürliche Liganden von CD4 sind MHC-Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen<sup>12</sup>.

Bei Infektion einer Zielzelle durch HIV bindet gp120 hochaffin an das CD4-Molekül auf der Zelloberfläche. Hierdurch wird eine Konformationsänderung von gp120 induziert, welche die Interaktion mit dem jeweiligen Chemokin-Corezeptor ermöglicht. Im folgenden erfährt gp41, der transmembranäre Anteil des Virushüllproteins gp160, eine Konformationsänderung, wobei der N-Terminus von gp41 in die Membran der Zielzelle inseriert. Es kommt zur Fusion der Virushülle mit der Zielzellmembran. Virale RNA und die zur Virusvermehrung benötigten Enzyme gelangen in das Zytoplasma. Dort bewirkt das virale Enzym Reverse Transkriptase die Transkription viraler RNA in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Durch das Enzym Integrase wird die virale cDNA in das Wirtsgenom eingegliedert. Die integrierte cDNA bezeichnet man als Provirus.

In ruhenden T-Zellen kann das Provirus latent persistieren, ohne daß eine Transkription stattfindet. Dies bezeichnet man als „latente Infektion“. Latent infizierte Zellen wie z.B. ruhende Makrophagen oder T-Gedächtniszellen (T-Memory-Zellen) stellen ein wichtiges Reservoir für HIV dar.

In aktivierten CD4-T-Zellen kommt es zur Transkription des Provirus. Dieser Schritt leitet die Virusreplikation ein: Aktivierte Zellen exprimieren Regulatorproteine wie den Transkriptionsfaktor NFκB. NFκB bindet an spezifische Sequenzen proviraler cDNA und

löst dadurch deren Transkription durch die zelluläre RNA- Polymerase aus. Die viralen RNA-Transkripte werden aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Die mRNA für die Regulatorproteine und für das env Genprodukt muss vor Translation zunächst gespleisst werden. Ungespleisste und gespleisste Transkripte werden translatiert und es entstehen die viralen Regulatorproteine und die strukturellen Komponenten, die zur Generierung neuer Viruspartikel erforderlich sind: Kapsid, Hüllproteine und die viralen Enzyme Reverse Trankriptase, Protease und Integrase. Einige virale Proteine entstehen über ein Vorläuferprotein, welches durch die HIV-Protease gespalten wird. Ungespleisste virale RNA-Transkripte bilden das RNA-Genom für die neu entstehenden Virionen. Sie werden mit den viralen Strukturproteinen und den viralen Enzymen zu neuen Viruspartikeln zusammengebaut (Aggregation) und aus der Zelle ausgeschleust (Budding).

## **1. 2. Die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 und ihre Rolle im Rahmen der HIV-Infektion**

### **1.2.1. Wissenschaftshistorische Einführung**

Nachdem CD4 als primärer Rezeptor von HIV identifiziert worden war<sup>10 11 13</sup>, zeigte sich im Rahmen von Experimenten, bei denen nicht-humane Zelllinien mit humanem CD4 transfiziert wurden, daß die Expression von CD4 allein nicht ausreichte, um eine Zelle für eine Infektion mit HIV empfänglich zu machen: Das Virus konnte zwar an der Zelloberfläche binden, die Membranfusion blieb jedoch aus<sup>13-15</sup>. Eine weitere Beobachtung war von großer Bedeutung: Es existierten verschiedenerlei Stämme von HIV-1 mit jeweils unterschiedlichem zellulären Tropismus. Die einen Stämme infizierten *in vitro* ausschließlich T-Zelllinien und primäre T-Zellen, nicht aber Monozyten und Makrophagen. Man bezeichnete sie als „T-trope“ Stämme. Den T-tropen HIV-Stämmen wurden „M-trope“ Stämme gegenübergestellt, welche ausschließlich Makrophagen, Monozyten und primäre T-Zellen, nicht aber transformierte T-Zelllinien infizierten. Man bezeichnete sie als „M-trope“ Stämme<sup>16-18</sup>. Infizierte man Zellkulturen mit T-tropen HIV-Stämmen, so war eine Verschmelzung der Zellen zu einem Synzytium zu beobachten. Bei M-tropen Stämmen kam es hingegen nicht zur Ausbildung eines Synzytiums<sup>16</sup>. Man bezeichnete T-trope Stämme von HIV

daher als „Synzytium-induzierend“ (SI) und M-trope Stämme als „nicht-Synzytium-induzierend“ (NSI).

Die beobachteten Phänomene waren nicht zu erklären, wenn man vom Vorhandensein nur eines einzigen HIV-Rezeptors ausging. Es wurde daher die Existenz von HIV-Corezeptoren postuliert.

Als erster HIV-Corezeptor wurde 1996 der  $\alpha$ -Chemokinrezeptor „fusin“ beschrieben: Die Arbeitsgruppe um *Feng* fand cDNA, welche CD4-positive murine Zelllinien mit HIV-1 infizierbar machte. Diese cDNA kodierte für einen Rezeptor, der die Zellfusion von T-tropen HIV-1-Stämmen mit CD4-positiven Zellen bewirkte<sup>19</sup>. Der als „fusin“ bezeichnete Rezeptor war in seiner Struktur bereits 1994 durch *Loetscher et al.* unter dem Namen LESTR (leukocyte-expressed seven-transmembrane-domain receptor) identifiziert worden, jedoch war seine Bedeutung als HIV-Corezeptor unbekannt geblieben<sup>20</sup>. LESTR/fusin wurde später im Sinne einer konsequenten Nomenklatur in „CXCR4“ umbenannt (siehe Abschnitt 1.2.2.).

Wenige Monate nach Entdeckung von LESTR/fusin als HIV-Corezeptor wurde sein natürlicher Ligand bekannt: das  $\alpha$ -Chemokin „Stromal derived Factor-1“ (SDF-1), später auch als CXCL-12 bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass SDF-1 den Eintritt von T-tropen HIV-Stämmen in die Zielzelle unterbindet, wohingegen M-trope HIV-Stämme im Beisein von SDF-1 in ihrer Infektiosität nicht beeinflusst wurden<sup>21 22</sup>.

Nach Entdeckung von CXCR4 als dem Corezeptor T-troper HIV-Stämme, stellte sich nun die Frage nach einem analogen Corezeptor für M-trope HIV-Stämme.

*Cocchi et al.* war bereits aufgefallen, dass die Infektion von Makrophagen durch M-trope HIV-1 Stämme durch Hinzugabe der  $\beta$ -Chemokine MIP (Macrophage Inflammatory Protein)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) unterbunden werden konnte. Die Infektion von T-Zellen mit T-tropen Stämmen hingegen wurde durch die genannten  $\beta$ -Chemokine nicht inhibiert<sup>23</sup>.

Kurze Zeit nach *Cocchis* Entdeckung machten *Paxton et al.* eine weitere wegweisende Beobachtung: sie berichteten über Individuen, die trotz multipler promisker Hochrisikokontakte HIV-negativ blieben. Die CD4-Zellen dieser sog. exponierten Nichtinfizierten zeigten *in vitro* eine relative Immunität gegen eine Infektion mit M-tropen Stämmen von HIV, nicht aber gegen eine Infektion mit T-tropen HIV-Stämmen. Die Anzahl der auf der Zelloberfläche der exponierten Nichtinfizierten exprimierten CD4-Moleküle war dabei nicht geringer, als in der nicht-exponierten HIV-negativen Referenzgruppe. Kurze Zeit später konnte der  $\beta$ -Chemokinrezeptor CCR5 als Co-

Rezeptor M-troper HIV-Stämme identifiziert werden<sup>24-29</sup> und es zeigte sich, dass bei den exponierten Nichtinfizierten ein homozygoter Defekt des *CCR5*-Gens im Sinne einer Deletion von 32 Basenpaaren vorlag<sup>29-31</sup>, welche zu einer phänotypischen Änderung von *CCR5* führte (*CCR5-Δ32*). *CXCR4* hingegen war bei diesen Individuen normal exprimiert, sodaß ihre CD4-T-Zellen *in vitro* leicht mit T-tropen HIV-Stämmen zu infizieren waren. Da die exponierten Nichtinfizierten HIV-negativ blieben, obwohl sie über einen intakten *CXCR4*-Rezeptor verfügten, schloss man daraus auf die dominierende Bedeutung der M-tropen HIV-Stämme für die HIV-Primärinfektion *in vivo*  
30 32 33

M-trope HIV-Stämme, die *CCR5* als Co-Rezeptor nutzen, wurden in der Folge als „R5-Stämme“ bezeichnet, T-trope Stämme, welche mit *CXCR4* interagieren wurden „X4-Stämme“ benannt.

### 1.2.2. Chemokine und Chemokinrezeptoren: Struktur, Funktion und Nomenklatur

*CCR5* und *CXCR4* gehören zur Familie der Chemokinrezeptoren. Der Terminus „Chemokin“ existiert seit 1992 und bezeichnet chemotaktisch wirksame Cytokine<sup>34</sup>. Chemokine verfügen über eine große Anzahl von Funktionen: sie dirigieren Effektorzellen des Immunsystems entlang eines Konzentrationsgradienten zu Entzündungsherden, sie spielen eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion, bei Hämatopoese und Angiogenese, sowie bei der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen<sup>12 35</sup>. Strukturell sind Chemokine Oligopeptide. Sie ähneln einander in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz. Bislang sind vier Chemokin-Subfamilien bekannt:  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ - und  $\delta$ -Chemokine.  $\alpha$ -Chemokine werden auch als „CXC-Chemokine“ bezeichnet, da sie strukturell zwischen zwei Cysteinresten eine einzelne Aminosäure enthalten.  $\beta$ -Chemokine werden analog als „C-C-Chemokine“ bezeichnet, da sie zusammenhängende Cysteinreste aufweisen.  $\gamma$ - oder „C-Chemokine“ verfügen nur über einen singulären Cystein-Rest nahe dem N-Terminus.  $\delta$ -Chemokine besitzen drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten. ( $CX_3C$ -Chemokine)<sup>12 20 36-38</sup>. Eine Übersicht über die vielfältigen Funktionen der Chemokine gibt Tabelle 1.

Die Chemokinrezeptoren werden nach der jeweils bindenden Chemokin-Unterfamilie benannt, an deren Namen ein „R“ für Rezeptor angehängt wird; analog zu den Chemokinen selbst werden die unterschiedlichen Rezeptoren mit arabischen Ziffern nummeriert. Die Chemokinrezeptoren sind strukturell miteinander verwandt: es handelt

sich um Glykoproteine mit sieben transmembranären helikalen Domänen, die an G-Proteine gekoppelt sind. Die unterschiedlichen Chemokinrezeptoren weisen eine strukturelle Homologie von ca. 35-60% ihrer Aminosäuresequenz auf. Dabei finden sich die Regionen hoher Variabilität im Bereich der extrazellulären Schleifen („loops“), sowie im Bereich von N-Terminus und C-Terminus. Im Bereich dieser hochvariablen Regionen finden Ligandenbindungen und rezeptorspezifische Interaktionen statt. Die transmembranären Regionen hingegen, sowie die zweite und dritte intrazelluläre Schleife, weisen bei unterschiedlichen Rezeptoren eine ausgeprägte Homologie auf<sup>37</sup>.

**Tabelle 1:** Chemokine und ihre Funktion (12 35)

Klasse	Rezeptoren	Chemokin Liganden	Liganden produziert von <sup>a</sup>	mobilisierte Zellen <sup>a</sup>	Hauptwirkungen
CXC-Chemokine (α-Chemokine)	CXCR4	SDF-1 (CXCL12)	SC	Naive TL, BL-Vorläufer, DC	B-Zell-Entwicklung, Homing,
CC-Chemokine (β-Chemokine)	CCR1 CCR3 CCR5	MIP-1α (CCL3)	Mo, MΦ, TL, BC, MC, N, NKC, F, Eos, Bas, AC SMC, MGC,	Mo, NKC, TL, DC, N, Thr, SMC, EC, Bas, Eos,	Proinflammatorische Wirkung, Chemotaxis, Stimulation der T <sub>H</sub> 1-Antwort, Extravasation von Entzündungszellen, Exozytose, Calcium-Influx
	CCR1 CCR3 CCR5	MIP-1β (CCL4)	Mo, TL, BL, N, NKC, DC, MGC, EC, SMC	Mo, NKC, TL, DC, N, Thr, SMC, EC	Siehe MIP-1α, verstärkte TL-Endotheladhäsion an VCAM-1
	CCR1 CCR3 CCR5	RANTES (CCL5)	TL, EZ, Thr	Mo, NKC, TL, Baso, Eos, DC	T-Zellaktivierung, Degranulation von Basophilen, chronische Entzündung
C-Chemokine (γ-Chemokine)	XCR1	Lymphotactin	TL	TL, Thy, NKC, DC	Entwicklung und Migration von Lymphozyten
CX <sub>3</sub> C-Chemokine (δ-Chemokine)	CX <sub>3</sub> CR1	Fractalkin (membran-gebunden)	Mo, EC, MGZ	Mo, TL	Leukozyten-Endothel-Adhäsion

<sup>a</sup> AC= Astrocyten, Bas= Basophile, BL= B-Lymphozyten, DC= Dendritische Zellen, Eos= Eosinophile, EC= Endothelzellen, F= Fibroblasten, MC= Mastzellen, MGC= Mikropgliazellen, Mo= Monozyten, MΦ= Makrophagen, N= Neutrophile, NKC= Natürliche Killerzellen, Thr= Thrombocyten, Thy= Thymozyten, TL= T-Lymphozyten, SC= Stromazellen, SMC= glatte Muskelzellen.

### 1.2.2.1. CXCR4

CXCR4 (CD184) ist ein Glykoprotein von 352 Aminosäuren Länge<sup>39</sup>. Wie alle Chemokinrezeptoren gehört CXCR4 zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren<sup>19</sup>. Der Rezeptor verfügt über vier extrazelluläre Domänen

(drei „loops“ und den N-Terminus). Zur Interaktion mit gp120 sind vor allem die erste und zweite extrazelluläre Schleife von CXCR4 von Bedeutung<sup>40</sup>. CXCR4 findet sich auf T- und B-Lymphozyten und monozytären Zellen, nicht aber auf Neutrophilen<sup>41</sup>. Sein einziger bislang bekannter Ligand ist SDF-1. SDF-1 wird von Stromazellen im Knochenmark gebildet. SDF-1 wirkt chemotaktisch auf Lymphozyten und Monozyten<sup>42</sup> und spielt darüber hinaus eine Rolle bei der B-Zell-Entwicklung (synonym: Pre-B-Cell-growth-stimulating factor, PBSF). Mäuse mit einem genetischen Defekt bezüglich der Expression von SDF-1 sterben bereits perinatal<sup>43</sup>.

#### **1.2.2.2. CCR5**

CCR5 (CD195) ist wie CXCR4 ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen. Auch CCR5 ist ein Glykoprotein mit 352 Aminosäuren Länge. CCR5 verfügt über vier extrazelluläre Domänen: drei „loops“ und die N-terminale Domäne<sup>24-29</sup>.

Interaktionen von CCR5 mit gp120 sind komplex und scheinen alle vier extrazellulären Rezeptordomänen miteinzubeziehen. Dem N-Terminus kommt dabei eine besondere Rolle bei der Interaktion mit gp120 zu, wohingegen die zweite extrazelluläre Schleife von CCR5 Membranfusion und den Eintritt von HIV in die Zielzelle induziert<sup>44</sup>.

Neben CD4- und CD8-positiven T-Zellen wird CCR5 auch auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und CD56-positiven NK-Zellen exprimiert<sup>37 45</sup>.

Darüberhinaus wurde CCR5 auch auf Fibroblasten, Gefäßendothelzellen, Astrozyten, Thymozyten und CD34-positiven Knochenmarkszellen identifiziert<sup>35</sup>. Betrachtet man die funktionellen Entitäten, so wird CCR5 fast ausschließlich auf Th<sub>1</sub>-Zellen exprimiert und fehlt nahezu auf Th<sub>2</sub>-Zellen<sup>46</sup>. Nachdem zunächst die drei  $\beta$ -Chemokine MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4) und RANTES (CCL5) als natürliche Liganden von CCR5 bekannt wurden (Tab.1), identifizierte man später sechs weitere CC-Chemokine mit dieser Funktion: LDP78 $\beta$  (eine Isoform von MIP-1 $\alpha$ ), MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7) und MCP-4 (CCL13) sowie Eotaxin (CCL11)<sup>35 47</sup>.

Die CCR5-Liganden unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Affinität gegenüber dem Rezeptor und in ihrer Potenz, eine HIV-Infektion zu inhibieren<sup>48</sup>.

MCP-3 wird als funktioneller Antagonist von CCR5 betrachtet, da dieses Chemokin zwar hochaffin bindet, aber anders als die anderen Liganden keine intrazelluläres Signal zu induzieren scheint<sup>48</sup>.



Die *CCR5-Δ32*-Mutation, die in ihrer homozygoten Form als Ursache für die relative Immunität gegenüber einer HIV-Infektion bei den „exposed uninfected“ identifiziert worden war, wird mit einem Alter von ca. 700-2000 Jahren als phylogenetisch relativ jung eingeschätzt. Dennoch ist diese Mutation insbesondere in der kaukasischen Bevölkerung recht häufig: die Prävalenz heterozygoter Merkmalsträger in einer kaukasischen Population beträgt ca. 20%, die der homozygoten Genträger ca. 1%<sup>30</sup>. In afrikanischen und asiatischen Populationen scheint die *CCR5-Δ32*-Mutation hingegen sehr selten zu sein. Bislang wurden nur wenige Individuen bekannt, die trotz einer homozygoten *CCR5-Δ32*-Mutation eine HIV-Infektion erwarben. Heterozygote Merkmalsträger weisen gegenüber Wildtypindividuen eine deutlich verminderte CCR5-Expression auf, welche nicht nur bei den erwarteten 50%, sondern lediglich bei 25-30% liegt. Klinisch zeigen heterozygote Merkmalsträger eine verminderte HIV-Transmissionsrate, ein besseres Ansprechen auf eine antiretrovirale Therapie, eine verringerte Lymphominzidenz und eine verlangsamte Progression zum Vollbild des erworbenen Immunschwächesyndroms (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS)<sup>9</sup>. Somit scheint nicht nur dem Vorhandensein von CCR5 auf der Zelloberfläche selbst, sondern auch der CCR5-Rezeptordichte eine wesentliche Bedeutung im Rahmen der Pathophysiologie der HIV-Infektion zuzukommen.

### **1.2.3. Die Bedeutung von CCR5 und CXCR4 für den Verlauf der HIV-Infektion**

Die HIV-Primärinfektion scheint unabhängig vom Infektionsweg durch M-trope „R5“-Stämme, die CCR5 als ihren Rezeptor benutzen, zu erfolgen. Dies legen auch die Beobachtungen an den „exponierten Nichtinfizierten“ nahe. Da die infektiösen Körperflüssigkeiten jedoch ein Gemisch aus M-tropen und T-tropen („X4“) HIV-Stämmen enthalten, muß im Rahmen der Erstinfektion eine Selektion von R5-Stämmen stattfinden<sup>49 50</sup>. An welcher Stelle diese Selektion erfolgt, ist bis heute nicht hinreichend geklärt.

In der Folge der HIV-Primärinfektion kommt es bei der Virusreplikation aufgrund der hohen Fehlerquote der Reversen Transkriptase zu Mutationen im Virusgenom. Es werden Virusmutanten mit höherer viraler Fitness selektiert, welche im Vergleich zum Wildtyp einen Shift in der *env*-Gensequenz des HIV-Genoms aufweisen. So könnte die Entstehung sogenannter „dual-troper“ (R5X4) Viren erklärt werden, die im Verlauf einer HIV-Infektion vorübergehend im Blut nachweisbar sind, und die sowohl CCR5 als auch CXCR4 als Co-Rezeptor nutzen können<sup>28 40</sup>. Mit weiterem Fortschreiten der Infektion

gewinnen zunehmend X4-Virusstämme die Oberhand<sup>51</sup>. X4-Stämme sind virulenter als R5-Stämme. Mit dem Erscheinen der X4-Stämme kommt es klinisch zu einem deutlichen Krankheitsprogress und zu einem Abfall der CD4-Zellzahl<sup>52,53</sup>. Es ist jedoch nach wie vor unklar, ob sich die X4-Stämme tatsächlich durch Mutation aus den R5-Stämmen entwickeln, oder ob sie von Beginn der Infektion an vorhanden sind, aber erfolgreich supprimiert wurden.

### **1.3. Das mukosale Immunsystem und seine Bedeutung für die HIV-Infektion**

#### **1.3.1. Einführung**

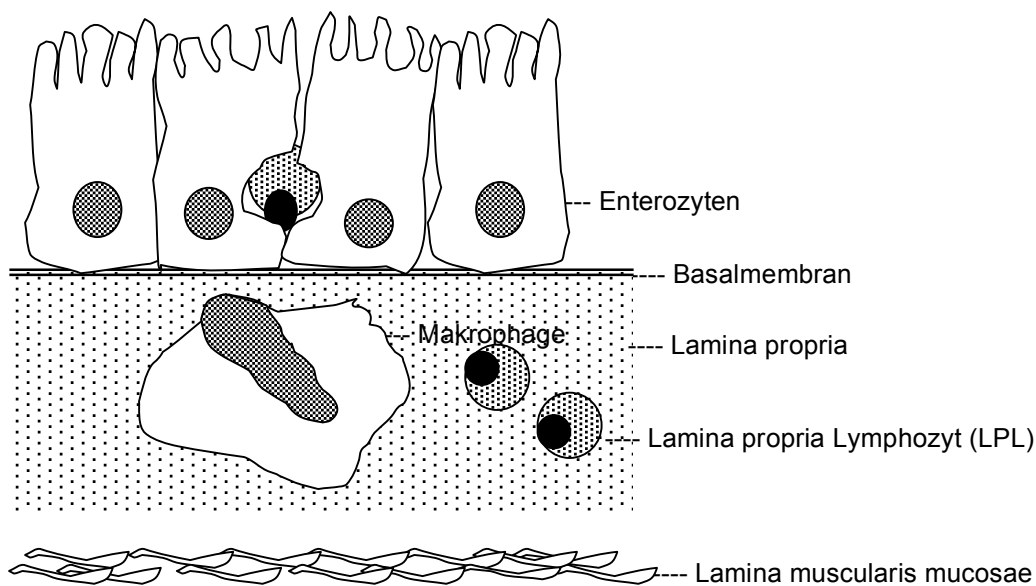
Schleimhautoberflächen sind die wichtigsten Eintrittspforten des HI-Virus in den menschlichen Körper. Mit einer Oberfläche von nahezu 400m<sup>2</sup> stellt die gastrointestinale Mukosa dabei die größte Kontaktfläche des Körpers mit seiner Umwelt dar<sup>54</sup>. Bei zwei der wichtigsten HIV-Infektionswege ist die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes zudem die erste Barriere, die das Virus überwinden muß, um in das Körperinnere zu gelangen: beim rezeptiven Analverkehr, sowie bei der perinatalen HIV-Infektion, welche durch Schlucken von Fruchtwasser bzw. Trinken infizierter Muttermilch erfolgt. Darüberhinaus stellt die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes das größte lymphatische Organ des Körpers dar. Sie ist ein wichtiges Reservoir für HIV-infizierte Zellen und bildet ein wesentliches Kompartiment für alle Stadien der HIV-Infektion. Es ist bekannt, dass der größte Anteil der HIV-Replikation im lymphatischen Gewebe und nicht im peripheren Blut stattfindet<sup>55</sup>. Der Gastrointestinaltrakt ist zudem ein häufiger Schauplatz von opportunistischen Infektionen und von Malignomen, die im Verlauf einer HIV-Infektion auftreten können und AIDS-definierend sind.

#### **1.3.2. Aufbau der intestinalen Mukosa**

Die intestinale Mukosa ist dreigeschichtet: Luminal befindet sich das Epithel mit den Enterozyten, das auf der Basalmembran fußt. Darunter liegt die Lamina propria, an welche sich basal die Lamina muscularis mucosae anschließt (Abb. 2).

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes muss sich mit einer großen Anzahl von Fremdartigen auseinandersetzen können. Hierzu verfügt sie über ein eigenes

Immunsystem. Das mukosale Immunsystem arbeitet hochdifferenziert: es ist in der Lage, nicht-pathogene Fremdantigene wie Nahrungsantigene oder Standortflora von pathogenen Fremdantigenen zu unterscheiden. Die zellulären Bestandteile des mukosalen Immunsystems sind teils in Follikeln oder Ansammlungen von Follikeln organisiert, teils befinden sie sich diffus im Epithel und in der Lamina propria verteilt. Das folliculär organisierte lymphatische Gewebe besteht in den Follikelzentren vorwiegend aus B-Zellen, wohingegen in den interfollikulären Regionen T-Zellen



**Abb.2:** Aufbau der intestinalen Mucosa (modifiziert nach<sup>56</sup>)

dominieren. Zusätzlich finden sich verschiedenartige antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und Follikuläre Dendritische Zellen. Die Lymphfollikel werden von einem spezialisierten follicelassoziierten Epithel (FAE) überzogen, welches unter anderem eine große Anzahl sogenannter M-Zellen enthält. M-Zellen sind zur Transzytose befähigte Zellen. Durch die M-Zellen gelangt antigenes Material zu Makrophagen und dendritischen Zellen, welche es prozessieren, und den B- und T-Lymphozyten präsentieren. Bei den folliculär organisierten Lymphozyten handelt es sich zumeist um naive, ruhende T- oder B-Zellen. Durch die Antigenpräsentation wird bei den ruhenden Lymphozyten in den Lymphfollikeln eine Immunantwort induziert, man spricht deshalb auch vom „induktiven Kompartiment“ des lymphatischen Gewebes. Die Lymphozyten wandern durch die efferenten Lymphbahnen in die mesenterialen Lymphknoten, wo sie sich vermehren. Über den Ductus thoracicus gelangen sie zurück ins periphere Blut. Als

aktivierte Lymphozyten rezirkulieren sie von dort ins lymphatische Gewebe. Diesen Prozess bezeichnet man als „homing“. Die aktivierten Lymphozyten kehren jedoch nicht in die Lymphfollikel zurück, sondern siedeln sich verstreut im Bereich von Lamina propria, Epithel und Submukosa an. Man bezeichnet diesen Teil des Immunsystems auch als „Effektorkompartiment“<sup>54 57 58</sup>.

Lymphozyten des Effektorkompartiments finden sich sowohl in der Lamina propria als auch im Epithel. In der Lamina propria machen T-Zellen rund ein Drittel der Lymphozyten aus, im Epithel hingegen sind es über 90%<sup>54</sup>. Es werden zwei wichtige T-Zellpopulationen unterschieden: die in der Epithelschicht zwischen den Enterozyten gelegenen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die diffus in der Lamina propria lokalisierten Lamina propria Lymphozyten (LPL). Nur durch die Basalmembran getrennt, handelt es sich doch um phänotypisch und funktionell unterschiedliche Zellpopulationen, die sich wiederum deutlich von den Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) unterscheiden.

### **1.3.3. Lamina propria Lymphozyten (LPL)**

Lamina propria T-Lymphozyten sind zu ca. 70% CD4-positiv und exprimieren zu ca. 30% CD8<sup>59 60</sup>. Sie sind fast ausschließlich TCR $\alpha\beta$  positiv, nur ein geringer Teil der LPL exprimiert den TCR $\gamma\delta$ -Rezeptor<sup>59-62</sup>. Somit stimmen LPL mit PBL in Hinblick auf die Verteilung der wichtigsten T-Zellpopulationen im wesentlichen überein.

Lamina propria T-Zellen zeigen jedoch einen anderen Aktivierungszustand als T-Lymphozyten des peripheren Blutes und T-Lymphozyten anderer Kompartimente des menschlichen Körpers. Phänotypisch findet dies Ausdruck in der Expression bestimmter T-Zell-Aktivierungsmarker wie CD45RO und CD69: LPL T-Zellen sind zu über 90% CD45RO-positiv<sup>62-64</sup> und ähneln in dieser Eigenschaft peripheren T-Memory Zellen. CD45RO wird nach Aktivierung exprimiert und ersetzt CD45RA, welches auf der Oberfläche naiver Zellen exprimiert wird.

Obwohl LPL-T-Zellen peripheren T-Memory Zellen zu gleichen scheinen, fehlen ihnen weitere morphologische Charakteristika dieser Zellpopulation. Es wurde daher angenommen, dass Lamina propria T-Zellen eine spezialisierte Untergruppe von T-Memory-Zellen darstellen<sup>62 64</sup>.

30-40% aller LPL T-Zellen exprimieren darüber hinaus CD103<sup>59 60 62-65</sup>. CD103 gehört zu den T-Zell Integrinen. Integrine sind heterodimere Proteine, die sich auf der Zelloberfläche von Leukozyten und Makrophagen befinden. Sie interagieren mit

endothelialen Adhäsionsmolekülen und extrazellulärer Matrix. Die Interaktion von Integrinen mit Adhäsionsmolekülen spielt eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von Entzündungszellen<sup>12</sup>, bei der T-Zell-Aktivierung, beim Homing und bei der Vermittlung von Effektorfunktionen<sup>66</sup>. CD103 (Integrin  $\alpha_E\beta_7$ ) war initial durch seine Expression auf T-Zellen der intestinalen Mukosa identifiziert worden. Intestinale IEL sind zu einem noch höheren Prozentsatz als LPL CD103-positiv<sup>60 61 67-71</sup>. Anders als andere Integrine, fehlt CD103 nahezu vollständig auf peripheren T-Zellen, die nur zu 1-2% CD103 exprimieren<sup>61-65</sup>. Der Ligand von CD103 ist E-Cadherin<sup>72</sup>, ein epitheliales Adhäsionsmolekül.

LPL vermitteln ihre Wirkung im wesentlichen durch Cytokinsekretion. Analog zu T-Memory-Zellen produzieren LPL IFN-gamma und IL-2. Sie unterstützen B-Zellen bei der Immunglobulinsynthese<sup>58 63</sup>.

#### **1.3.4. Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)**

Intraepitheliale T-Lymphozyten (IEL) finden sich an der basolateralen Seite des mukosalen Epithels zwischen den Enterozyten (Abb. 2). In dieser Lokalisation kommen sie mit den zahlreichen Antigenen des Darminhaltes unmittelbar in Kontakt. Bei den IEL handelt es sich um eine phänotypisch und funktionell einzigartige Lymphozytenpopulation, die sich von peripheren T-Zellen, aber auch von Lamina propria Lymphozyten unterscheidet.

IEL sind überwiegend CD8-positiv, ein geringerer Teil der IEL exprimiert CD4<sup>61 65 67 68 73-78</sup>, es gibt jedoch auch einen relativ großen Anteil doppelt negativer (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) und doppelt positiver (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) IEL<sup>79</sup>. Doppelt positive und doppelt negative T-Zellen machen demgegenüber im peripheren Blut nur einen verschwindend geringen Anteil aller T-Zellen aus<sup>80</sup>.

Die Expression von TCR $\gamma\delta$  auf IEL ist etwas stärker als auf LPL, jedoch ist sie nicht so ausgeprägt, wie ursprünglich angenommen. Letzteres lässt sich dadurch erklären, daß initial veröffentlichte Daten zum Phänotyp von IEL aus Analysen von Tiermodellen stammten. Die IEL einiger Tiermodelle weisen jedoch im Vergleich zu humanen IEL erhebliche phänotypische Unterschiede auf: So exprimieren IEL von Mäusen und Hühnern überwiegend TCR $\gamma\delta$ <sup>79 81 82</sup>, wohingegen beim Menschen und bei der Ratte nur ca. 5-15% der IEL TCR $\gamma\delta$ -positiv sind<sup>61 83 84</sup>.

Wie LPL, so sind auch IEL überwiegend CD45R0<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-61 69</sup>, was auf eine Aktivierung durch einen vorangegangenen Antigenkontakt schließen lässt. IEL sind zu ca. 80-90% CD103-positiv<sup>61 65 67-71 85</sup>. Aufgrund der ausgeprägten Expression von CD103 auf IEL und seiner Bedeutung als Ligand eines epithelialen Adhäsionsmoleküls, nahm man zunächst an, dass CD103 eine Rolle als Homing-Rezeptor für intestinale Lymphozyten spiele und für ihre Lokalisation in der intestinalen Mukosa verantwortlich sei. In der Folge zeigten *Schön et al.*, dass CD103-Knock-out Mäuse sich phänotypisch von Wildtyp-Mäusen durch eine verminderte Anzahl von IEL und LPL unterscheiden. Insgesamt fiel die Verringerung der T-Zellzahlen jedoch geringer aus als erwartet und schwankte zudem erheblich zwischen knock-out-Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und unterschiedlichen Umgebungsbedingungen<sup>86</sup>. *Lefrancois et al.* fanden demgegenüber keinerlei Bedeutung von  $\alpha_E\beta_7$  (CD103) für Homing und Retention von IEL bzw. LPL in der intestinalen Mukosa und favorisierten die Bedeutung andere Integrine, wie z.B. Intergrin  $\alpha_4\beta_7$  in diesem Kontext<sup>87</sup>. *Ericsson et al.* beobachteten, dass CD103-positive CD8-T-Zellen zu einem sehr hohen Prozentsatz den Chemokinrezeptor CCR9 co-exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen aus mesenterialen und peripheren Lymphknoten nach Aktivierung weiterhin CCR9 exprimierten, wohingegen CD103 herunterreguliert wurde<sup>88</sup>. Erst nach Einwanderung in das intestinale Epithel wurde CD103 erneut heraufreguliert. Jedoch könnte die Interaktion von CD103 mit seinem epithelialen Liganden E-Cadherin eine Rolle bei der Retention von IEL im intestinalen Epithel spielen. Die physiologische Bedeutung, die der CD103-Expression auf mukosalen T-Zellen zukommt, sowie die Faktoren, die seine Expression und funktionelle Modulation beeinflussen, sind somit bislang nicht eindeutig geklärt<sup>89</sup>: Funktionell sind IEL vorwiegend zytotoxische T-Zellen<sup>90</sup>. Sie produzieren eine Reihe von Cytokinen, darunter IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Vermutlich kommt den IEL dadurch eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen zu. IEL sind in direkter Nachbarschaft zu den mukosalen Epithelzellen lokalisiert und scheinen mit diesen auch funktionell zu interagieren: über die o.g. Zytotoxizitätsmechanismen haben sie die Möglichkeit, geschädigte oder transformierte Epithelzellen zu eliminieren<sup>79 90</sup>. Die Anzahl von IEL ist im Kontext verschiedenartiger Erkrankungen vermehrt, z.B. bei einheimischer und tropischer Sprue, bei parasitären und viralen Infektionen, bei Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Autoimmunerkrankungen, Graft-versus-host

Reaktionen und intestinalen Lymphomerkkrankungen<sup>75 91-93</sup>. Demgegenüber kommt es im Zuge der HIV-Infektion zu einem quantitativen Verlust von IEL in der Darmschleimhaut<sup>94</sup>.

### 1.3.5. Die mukosale HIV-Infektion

Zielzelle für HIV-1 ist die CD4-positive und CCR5- bzw. CXCR4-positive aktivierte T-Zelle. Der größte Teil der aktivierten CD4-positiven T-Zellen findet sich im Bereich des mukosalen Immunsystems<sup>57</sup>. Die intestinale Mukosa ist daher ein Hauptschauplatz für alle Stadien der HIV-Infektion. Sie spielt eine wichtige Rolle für HIV-Replikation und Viruspersistenz. Auch unter effektiver antiretroviraler Therapie, bei der die Viruslast von HIV im peripheren Blut unter der Nachweisgrenze von ca. 50 Kopien/µl liegt, kann in Biopsien aus der intestinalen Mukosa noch HI-Virus nachgewiesen werden<sup>95</sup>.

Im Rahmen einer primären HIV-Infektion erreicht HIV-1 seine Zielzellen in der intestinalen Mukosa entweder direkt von luminal, oder über den Blutweg<sup>55</sup>.

Rezirkulierende T-Zellen könnten im peripheren Blut mit HIV-infiziert werden und anschließend im Rahmen des „Homings“ in die intestinale Mukosa zurückkehren. Dies würde erklären, warum bereits in einem frühen Infektionsstadium eine große Anzahl HIV-infizierter Lamina propria Lymphozyten im Dünndarm nachzuweisen sind<sup>96</sup>.

*Meng* et al. postulierten folgendes Modell für die intestinale HIV-Primärinfektion: Tritt HIV von der Seite des Darmlumens in den Körper ein, wie z.B. beim rezeptiven Analverkehr oder beim Trinken von Muttermilch der Fall, so wird das Virus per Tranzytose durch die Epithelschicht der Enterozyten hindurchgeschleust<sup>97</sup>. Enterozyten exprimieren zwar nicht den primären HIV-Rezeptor CD4, jedoch tragen sie auf ihrer Oberfläche das Glykosphingolipid Galactosylceramid (Gal Cer), welches auf Epithelzellen als eine alternative HIV-Bindungsstelle fungieren kann<sup>98</sup>. Von den beiden wichtigsten HIV-Co-Rezeptoren wird nur CCR5 auf Enterozyten exprimiert. Diese Tatsache würde erklären, warum bei enteral erworbenen HIV-Primärinfektionen nur R5-Stämme von HIV-1 eine Rolle spielen und warum Individuen mit einem genetischen Defekt für CCR5 trotz multipler Hochrisikokontakte HIV negativ bleiben können<sup>29</sup>.

Rasch nach einer primären HIV-Infektion kommt es – unabhängig vom Infektionsweg – zu einem Abfall der CD4-T-Zellzahl im Effektorcompartment der intestinalen Mukosa. Messungen der CD4-Zellzahl im peripheren Blut sind hierbei nicht repräsentativ für die Verhältnisse in der Darmschleimhaut, wo der CD4-Zell-Verlust früher einsetzt und ausgeprägter ist als im Blut<sup>96</sup>. Neben einem quantitativen Verlust von CD4-Zellen

kommt es zusätzlich zur Funktionseinschränkung der vorhandenen CD4-Zellen. Dies äußert sich z.B. in einer verminderten T-Helfer-Funktion für die B-Zell-Differenzierung und Immunglobulinsynthese, einer Verringerung der antigeninduzierten T-Zellproliferation, sowie in einer verminderten Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Parallel zum Abfall der T-Zellzahl kommt es zu einem quantitativen Anstieg zytotoxischer CD8-Zellen in der intestinalen Mukosa. CD8-T-Zellen spielen eine Rolle bei der Kontrolle der HIV-Infektion, sie können jedoch auch eine Schleimhautschädigung herbeiführen. Anders als bei anderen entzündlichen Prozessen im Darm ist bei der HIV-Infektion die Anzahl CD25-positiver Zellen in der Lamina propria nicht vermehrt, sondern vermindert, was auf eine inadäquate T-Zellaktivierung hinweist. Zahlenmäßige Verringerung und eingeschränkte Funktion der Lamina-propria T-Zellen führt bei HIV Patienten auch zu einer gestörten Mukosaarchitektur<sup>58</sup>. Klinische Folge der mukosalen Immundefizienz ist das Auftreten von opportunistischen und nichtopportunistischen Infektionen, von Malabsorptionssyndrom und Malignomen<sup>99 100</sup>.

## 1.4. Fragestellungen

Vor dem Hintergrund der besonderen Bedeutung, die dem mukosalen Immunsystem im Kontext der HIV-Infektion zukommt, erschien es uns wichtig, die Expression der HIV-Corezeptoren CCR5 und CXCR4 auf intestinalen Lymphozyten zu untersuchen.

Um beurteilen zu können, ob sich das Expressionsmuster der beiden Rezeptoren im Verlaufe einer HIV-Infektion, im Rahmen anderer entzündlicher Prozesse oder unter antiretroviraler Therapie ändert, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Rezeptorstatus bei HIV-negativen Individuen bestimmt werden.

Von besonderem Interesse im Kontext der HIV-Infektion erschien es uns, die Expression der beiden HIV-Corezeptoren auf CD4-positiven intestinalen T-Zellen zu untersuchen, und mit der Expression auf peripheren CD4-positiven T-Zellen zu vergleichen.

Zu klären war, ob die Tatsache, dass die Primärinfektion von HIV nahezu ausschließlich durch R5-Stämme erfolgt, auf eine nur geringfügige Expression von CXCR4 auf CD4-Lymphozyten zurückzuführen sei. Da HIV-1 bevorzugt in aktivierten Zellen repliziert,



war für uns auch von Interesse, ob sich dieses Phänomen auch auf eine vermehrte Expression von HIV-Corezeptoren auf aktivierten Zellen erkläre.

Neben ihrer Funktion als HIV-Corezeptoren vermitteln CCR5 und CXCR4 als Chemokinrezeptoren gerichtete Chemotaxis und spielen so eine Rolle im Rahmen zahlreicher entzündlicher Prozesse, sowie bei der Leukozytenmigration. Da Chemokine ihre Wirkung jeweils auf bestimmte funktionell definierte Zellgruppen ausüben, erschien es uns sinnvoll, verschiedene in ihrer Effektorfunktion unterschiedliche T-Zellsubgruppen separat zu vergleichen.

Im Rahmen von Migration und Homing, können rezirkulierende intestinale Lymphozyten mit HIV infiziert werden. Dies könnte erklären, warum bereits kurz nach einer primären HIV-Infektion, unabhängig vom Infektionsmodus, ein Verlust von CD4 Zellen in der Mukosa des gesamten Intestinaltraktes zu verzeichnen ist. Vor diesem Hintergrund war es für uns von Interesse, ob CCR5 und CXCR4 bevorzugt auf der CD103-negativen intestinalen T-Zellpopulation nachzuweisen wäre, da es Hinweise gibt, dass CD103 durch Interaktion mit seinem Liganden E-Cadherin eine Rolle bei der Retention von T-Zellen in der intestinalen Mukosa zu spielen scheint.

Wir untersuchten daher die Expression von CCR5 und CXCR4 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen, sowie auf  $\alpha\beta$ - bzw.  $\gamma\delta$ -T-Zellen als den wichtigsten hinsichtlich ihrer Effektorfunktion unterschiedlichen T-Zell Subpopulationen. Zudem betrachteten wir die Expression der beiden Chemokinrezeptoren in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter Marker der T-Zelldifferenzierung (CD45R0) und T-Zellaktivierung (CD25, CD69, HLA-DR), sowie von CD103. Verglichen wurde die Expression jeweils auf peripheren T-Zellen, sowie auf IEL und LPL.