

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass beide Chemokinrezeptoren, CCR5 und CXCR4, in der intestinalen Mukosa sowohl auf LPL-, als auch auf IEL-T-Zellen exprimiert werden. CCR5 war auf intestinalen T-Zellen zu einem signifikant höheren Prozentsatz exprimiert, als auf T-Zellen des peripheren Blutes. Die Expression von CXCR4 war prozentual auf LPL am ausgeprägtesten und überschritt die CXCR4-Expression auf IEL und PBL signifikant.

Neben der Expression der beiden Chemokinrezeptoren wurde die Expression von Antigenen der T-Zelldifferenzierung und T-Zellaktivierung untersucht. Die geschilderten Verteilungsverhältnisse der CCR5- und CXCR4-Expression im Vergleich von LPL, IEL und PBL-T-Zellen blieben dabei in den verschiedenen untersuchten T-Zell-Subpopulationen erhalten.

Bezüglich der prozentualen Expression der untersuchten T-Zellmarker stimmten unsere Daten im Wesentlichen mit der internationalen Literatur überein. Diskrepanzen ergaben sich in Bezug auf den Phänotyp der IEL: während in der Literatur zu finden ist, dass IEL nur zu einem geringen Teil von ca. 10-15% CD4-positiv sind<sup>61 65 68 73 74 76 83 103</sup>, lag die CD4-Expression der von uns untersuchten IEL im Median bei rund 40%. CD8 wurde entsprechend von rund 60% der IEL exprimiert; Literaturdaten beschreiben demgegenüber eine 70-90%ige Expression von CD8 auf IEL<sup>61 65 76 78</sup>. *Ullrich et. al.*, die in einer ihrer Arbeiten Verteilungsverhältnisse für CD4 und CD8 fanden, die den vorliegenden ähnlich sind, erklärten dies durch eine mögliche Kontamination mit LPL<sup>70</sup>. Gegen eine relevante Kontamination der isolierten IEL durch LPL spricht, dass unser übriges IEL-Markerprofil mit dem in der Literatur angegebenen übereinstimmt und sich in der für IEL charakteristischen Weise von demjenigen der untersuchten LPL unterscheidet. So exprimierten in Übereinstimmung mit Literaturwerten rund 80% der IEL CD103, gegenüber ca. 30% der LPL<sup>61-63 70 71</sup>. Auch stimmt die anteilige Expression von CD4 bzw. CD8 auf LPL und PBL mit den Literaturdaten überein<sup>59-61</sup>, sodaß wir nicht von einem Defekt der verwendeten anti-CD4 bzw. anti-CD8-Antikörper ausgehen. In der Literatur wird auf die hohe interindividuelle Spannbreite der Antigenexpression auf IEL verwiesen<sup>71</sup>, die auch bei unseren Probanden zu beobachten war (Abb. 4) und die angesichts der kleinen Fallzahl in besonderem Maße zum Tragen kommen kann.

Wir vermuten, dass dieses Phänomen im wesentlichen für die von uns gefundenen Verteilungsverhältnisse bei der CD4- bzw. CD8-Expression verantwortlich war. Schließlich ist auch nicht auszuschließen, dass die entzündlichen oder malignen Grunderkrankungen der Patienten, aus deren Darmresektaten die intestinalen Zellen isoliert wurden, einen Einfluss auf den Phänotyp der isolierten Zellen hatten, auch wenn die untersuchten Anteile der Resektate makroskopisch unauffällig waren. Sogar ein Einfluss von perioperativem Stress, Narkose und Operationstechnik sind denkbar.

Die Frage der quantitativen Expression der T-Zell-Rezeptoren  $TCR\alpha\beta$  und  $TCR\gamma\delta$  auf intestinalen Lymphozyten wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wurde von einigen Autoren postuliert, dass IEL zu einem weitaus größeren Teil  $TCR\gamma\delta$ -positiv seien als PBL oder LPL, die diesen T-Zellrezeptor jeweils nur zu rund 5% auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Daten stammten jedoch aus Beobachtungen an murinen und aviären IEL und ließen sich in der Folge für humane IEL nicht nachvollziehen<sup>82</sup>. Auch wir fanden lediglich eine  $TCR\gamma\delta$ -Expression von im Median 6% auf IEL. Andere Arbeitsgruppen beschrieben vergleichbare Werte<sup>59 68 82-85</sup>. Auch bei der  $TCR\gamma\delta$ -Expression fiel jedoch die erhebliche Spannweite der Ergebnisse der Einzelexperimente auf. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Expression von  $TCR\gamma\delta$  auf IEL gegenüber der Expression des Rezeptors auf LPL oder PBL

Die Tatsache, dass LPL und IEL zu einem größerem Anteil CCR5- und CXCR4-positiv sind als PBL, ist nicht allein auf deren Aktivierungszustand zurückzuführen, der dem von Memory-T-Zellen im Blut ähnelt: Betrachtete man zum Vergleich die CD45RO-positiven peripheren T-Memory-Zellen, so waren beide Chemokinrezeptoren auch in dieser Population zu einem geringeren Prozentsatz exprimiert, als auf intestinalen T-Zellen (signifikant für CCR5 auf IEL und LPL und für CXCR4 auf LPL). Dies stützt die Annahme, dass es sich bei IEL und LPL um jeweils eigenständige, hochspezialisierte T-Zell-Subpopulationen handelt, die trotz gemeinsamer Merkmale phänotypisch und funktionell nicht mit Memory-T-Zellen des peripheren Blutes gleichzusetzen sind<sup>63</sup>.

CCR5 wurde vermehrt auf aktivierten, differenzierten T-Zellen exprimiert ( $CD45RO^+$ ,  $CD69^+$ ,  $CD103^+$ ,  $HLA-DR^+$ ). Die Expression von CXCR4 verhielt sich weitgehend komplementär zur Expression von CCR5: CXCR4 wurde bevorzugt auf naiven,

ruhenden T-Zellen (CD45R0<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>) exprimiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von *Bleul et al.*<sup>41</sup> und *Ostrowski et al.*<sup>104</sup> an peripheren T-Zellen überein. Signifikante Unterschiede bei der CXCR4-Expression auf naiven bzw. ruhenden gegenüber aktivierten Zellen konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur für intestinale T-Zellen, nicht aber für PBL nachvollzogen werden.

Das komplementäre Expressionsverhalten von CCR5 und CXCR4 war auch beim Vergleich von intestinalen CD4- und CD8-T-Zellen zu beobachten, wobei CXCR4 bevorzugt auf CD4-Zellen, CCR5 hingegen auf CD8-T-Zellen exprimiert wurde. Auch in Abhängigkeit vom T-Zell-Rezeptor fand sich eine gegensätzliche Expression der beiden Chemokinrezeptoren: CCR5 war bevorzugt auf TCR $\gamma\delta$ -positiven Zellen exprimiert. CXCR4 hingegen wurde bevorzugt auf TCR $\gamma\delta$ -negativen (TCR $\alpha\beta$ -positiven) Zellen exprimiert.

Die Ursache für das Phänomen, dass CCR5 eher auf aktivierten, differenzierten T-Zellen exprimiert wird und CXCR4 eher auf ruhenden, naiven T-Zellen könnte darin begründet liegen, daß in Abhängigkeit von zellulären Differenzierungsstadium und Aktivierungszustand eine unterschiedliche Chemokinantwort erforderlich ist.

Intestinale CD4-T-Zellen sind vor dem Hintergrund der mukosalen HIV-Infektion als potentielle Zielzellen von großem Interesse. CCR5 und CXCR4 waren sowohl auf mukosalen als auch auf peripheren CD4-T-Zellen nachweisbar, jedoch wurden beide Chemokinrezeptoren auf intestinalen CD4-T-Zellen zu einem signifikant größeren Anteil exprimiert als auf CD4-positiven peripheren T-Zellen. Unsere Ergebnisse stimmen hierin mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein<sup>104-107</sup>. Demgegenüber fanden *Lapenta et al.* und *Meng et al.* keinen Unterschied in der CXCR4-Expression von CD4-positiven PBL gegenüber CD4-positiven LPL<sup>105 106</sup>. *Meng* beschreibt eine CXCR4-Expression auf jeweils rund 85% der CD4-positiven LPL und PBL. Diese Angabe bezieht sich allerdings auf Beobachtungen an lediglich einem einzigen Probanden. Bei *Lapenta et al.* fehlen Prozentangaben zur Quantifizierung der CXCR4-Expression. Auch *Ostrowski et al.* fanden CXCR4 auf über der Hälfte der PBL CD4-T-Zellen exprimiert<sup>104</sup>. *Bermejo et al.* hingegen beschreiben eine CXCR4-Expression auf PBL, die mit der von uns gemessenen übereinstimmt und bei rund 10% liegt<sup>108</sup>. Diskrepante Befunde könnten auch hier die Folge einer ausgeprägten interindividuellen Spannweite der Chemokinrezeptorexpression sein, die auch in der Literatur vielfach hervorgehoben wird<sup>104 107</sup>, und die darin begründet sein könnte, dass

Chemokinwirkungen im Kontext verschiedenartigster physiologischer und pathologischer Prozesse eine Rolle spielen. Um die Vielfalt dieser möglichen Einflüsse zu illustrieren, sei auf die Arbeit von *Peters et al.* verwiesen, die zeigen konnten, daß sogar das Sexualverhalten der Probanden Einfluß auf die Chemokinrezeptorexpression im peripheren Blut hat, da es durch den Kontakt mit Fremdartigenen des Partners zu einer Alloimmunisation kommt, welche *in vitro* in Form einer verminderten Expression von CCR5 und CXCR4 gegenüber der sexuell karenten Kontrollgruppe nachweisbar war<sup>109</sup>.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass intestinale CD4-positive Lymphozyten durch ihren Aktivierungszustand und durch ein hohes Maß an CCR5- und CXCR4-Expression potentiell für eine HIV-Infektion empfänglich sind. Zielzellen für die HIV-Replikation dürften hierbei vor allem die Corezeptor-positiven CD4<sup>+</sup>-LPL sein, da IEL aufgrund ihrer luminalen Lage einem ausgeprägten Abschilferungsprozeß unterliegen.

Ein Phänomen der HIV-Pathogenese, welches bis heute noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ist die Selektion von R5-Virusstämmen, welche im Rahmen der HIV-Primärinfektion unabhängig vom Infektionsmodus zu beobachten ist.

*Bleul et al.* vermuteten den Schlüssel zur Erklärung dieser Beobachtung in der Tatsache, dass CCR5 überwiegend auf aktivierten, differenzierten, CD45R0-positiven Zellen zu finden wäre, CXCR4 jedoch überwiegend auf naiven, CD45R0-negativen Zellen exprimiert würde<sup>41</sup> wobei man davon ausging, dass eine HIV-Replikation nur in aktivierten Zellen stattfände<sup>110</sup>. *Bleuls* Argumentation bezog sich allerdings ausschließlich auf PBL und ließ außer Acht, dass periphere T-Zellen bei den epidemiologisch bedeutsamen enteralen Infektionsmodi nicht die primäre Zielzellpopulation darstellen, sondern vielmehr T-Zellen der intestinalen Mukosa. Diese wiederum sind nahezu vollständig CD45R0-positiv und exprimieren sowohl CD4, als auch CCR5 und CXCR4 zu einem hohen Anteil, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Von Seiten des Aktivierungszustandes und des Rezeptorstatus' sollten intestinale CD4-Zellen somit nicht nur mit R5-, sondern auch mit X4-Stämmen infizierbar sein. Auch konnte von uns entgegen *Bleuls* Argumentation keine signifikante Mehrexpression von CCR5 auf CD45R0-positiven gegenüber CD45R0-negativen PBL nachvollzogen werden. Eine signifikant vermehrte Expression von CCR5 auf CD45R0-positiven gegenüber der CD45R0-negativen Vergleichspopulation ließ sich nur an intestinalen T-Zellen nachweisen.

Die Selektion von R5-HIV-Stämmen im Rahmen der Erstinfektion versucht das Modell von *Meng et al.*<sup>97</sup> mit der Begründung zu erklären, dass HIV mittels Transzytose durch Enterozyten hindurchgeschleust werden müsse, um die eigentlichen Zielzellen in der Lamina propria zu erreichen. Da Enterozyten nur CCR5, nicht aber CXCR4 exprimieren, würden X4-Stämme gleich einem Filter ausgesondert. Dieses Modell vermag allerdings nicht zu erklären, weshalb auch bei der parenteralen HI-Virusinfektion, bei der Transzytosephänomene keine Rolle spielen dürften, eine Selektion von R5-Stämmen stattfindet. Eine fehlende Funktionalität des CXCR4-Rezeptors konnte für Monozyten des peripheren Blutes nachgewiesen werden, wohingegen CXCR4-positive periphere CD4-T-Zellen mit HIV infizierbar waren und das Virus replizierten<sup>106 111</sup>. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Anzahl der Antikörperbindungsstellen für CXCR4 auf PBL nur etwa halb so hoch war, wie die Zahl der Antikörperbindungsstellen von CCR5. Man folgerte aus dieser Beobachtung, dass die quantitative Dimension der jeweiligen Chemokinrezeptorexpression auf der Oberfläche einer Zielzelle eine Auswirkung auf deren Infizierbarkeit habe<sup>107</sup>. Diese Annahme wurde jedoch von anderen Autoren widerlegt, die selbst dann noch eine produktive HIV-Infektion nachweisen konnten, wenn nur geringe Mengen von Corezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert wurden<sup>112</sup>. Diskutiert wird auch, ob CD4-positive mukosale Langerhanszellen und submukosale Makrophagen, die ausschließlich CCR5-positiv sind, bzw. über einen dysfunktionalen CXCR4-Rezeptor verfügen, eine Rolle bei der Selektion M-troper Stämme spielen<sup>113</sup>. Auch hierbei jedoch bliebe eine Erklärung für der Selektion von R5-Stämmen beim parenteralen Infektionsweg aus.

Worin sich das Phänomen der R5-Selektion tatsächlich begründet, ist nach wie vor unklar. Es lässt sich unseren Beobachtungen zufolge jedoch nicht durch eine unzureichende Expression von CXCR4 als dem Co-Rezeptor für X4-Stämme auf CD4-positiven intestinalen oder peripheren T-Zellen erklären.

Welche therapeutischen Möglichkeiten ergeben sich aus der Bedeutung von CCR5 und CXCR4 als Co-Rezeptoren von HIV? – Klinische Beobachtungen haben gezeigt, dass Individuen, welche die  $\Delta 32$ bp-Mutation von CCR5 aufweisen, trotz multipler Hochrisikokontakte HIV-negativ blieben. Der deletäre CCR5-Rezeptor schien den Betroffenen dabei keinen gesundheitlichen Nachteil zu bringen, sodaß auch eine pharmakologische Blockade von CCR5 ohne negative Konsequenzen durchführbar sein

müßte. Die Blockade von CCR5 könnte durch Chemokinanaloge oder durch monoklonale Antikörper erfolgen. Da R5-Stämme von HIV bei der Primärinfektion führend sind, könnte eine erfolgreiche unmittelbar postexpositionelle Blockade von CCR5 als Primärprävention der HIV-Infektion Bedeutung gewinnen. Denkbar wäre in diesem Kontext eine topische Blockade von Chemokinrezeptoren in Abhängigkeit vom jeweiligen Infektionsmodus (rektal, vaginal etc.). Ein oral applizierter CCR5-Rezeptorantagonist könnte durch Blockade von CCR5 auf intestinalen Lymphozyten die Infektion dieser Zellpopulation mit HIV reduzieren und somit den Verlust intestinaler CD4-Zellen nach einer HIV-Erstinfektion eindämmen<sup>96</sup>.

Die Blockade von CCR5 in frühen Stadien der HIV Infektion könnte ein Fortschreiten der Erkrankung aufhalten. Problematisch wäre hier möglicherweise, daß eine selektive Blockade von CCR5 einen Selektionsdruck zum Vorteil der virulenteren X4-Stämme auslösen könnte. In fortgeschrittenen Stadien der HIV-Infektion und bei Patienten mit langer Vorbehandlung dürfte eine Therapie mit CCR5-Rezeptorblockern nicht ausreichend sein, da bei dieser Patientengruppe nur noch zu ca. 50% R5-trope Viren vorliegen<sup>114</sup>. Vor Einsatz eines CCR5- bzw. CXCR4- Blockers müsste demnach eine Phänotypisierung hinsichtlich der jeweiligen Corezeptoraffinität der HI-Viren eines Patienten durchgeführt werden, und diese müsste ggf. im Verlauf der Therapie wiederholt werden. Vor diesem Hintergrund erscheint die Entwicklung eines kombinierten CCR5/CXCR4-Blockers (sog. „Double-Entry-Blocker“) attraktiv. Ob eine Blockade von CXCR4 ohne negative klinischen Konsequenzen wäre, kann derzeit jedoch noch nicht hinreichend beantwortet werden: Daten aus dem Mausmodell zeigen, dass CXCR4- oder SDF-1-knock-out Mäuse schwere Entwicklungsdefekte aufweisen und nicht lebensfähig sind<sup>115 116</sup>. Welche physiologische Rolle CXCR4 und sein Ligand SDF-1 jenseits der embryonalen Entwicklung spielen, ist noch unklar. CCR5 und CXCR4-Blocker werden aktuell im Rahmen klinischer Studien geprüft.

Auch gentherapeutische Strategien, welche eine Herunterregulation von Chemokinrezeptoren bewirken könnten, werden gegenwärtig überprüft. Gentherapie im Sinne einer intrazellulären Immunisierung könnte zum Vorteil haben, dass die Problematik viraler Resistenz umgangen wird, die den Nutzen der konventionellen antiretroviralen Therapie begrenzt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der Einsatz intrazellulärer Chemokine, sogenannter Intrakine, welche die Expression von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche verhindern können<sup>117</sup>. Ein weiteres gentherapeutisches Konzept welches bereits zur Bekämpfung viraler Infektionen in der

Pflanzenwelt Anwendung findet, ist die RNA-Interferenz: hierbei wird doppelsträngige RNA enzymatisch in kurze Buchstücke, sog. siRNA („short interfering RNA“), gespalten. Sequenzspezifische siRNA-Moleküle binden komplementär an längere mRNA-Stücke und können diese selektiv degradieren<sup>9</sup>, wodurch es zu einer gezielten Hemmung der Expression viraler oder zellulärer Genprodukte kommt. Durch RNA-Interferenz (RNAi) mit Einsatz spezifischer siRNA konnte *in vitro* die Expression von CD4, CXCR4 und CCR5, sowie von viralen Transkripten blockiert werden. Da CD4 eine essentielle Bedeutung für das Immunsystem hat, ist eine Blockade der CD4-Expression physiologisch nicht praktikabel. Vielversprechend erscheint demgegenüber ein Ansatz, bei dem durch RNA-Interferenz *in vitro* die Expression beider Chemokinrezeptoren simultan inhibiert werden konnte<sup>118</sup>.

Aus der Beobachtung, dass naive periphere CD4-Zellen *in vitro* eine Replikation von HIV nicht unterstützen und sogar eine HIV-Replikation in Memory Zellen zu inhibieren vermögen<sup>112 119</sup>, folgern einige Autoren einen möglichen Ansatz für eine HIV-Immuntherapie im Sinne einer Ex-vivo-Expansion und nachfolgenden Reinfusion autologer CD4-Zellen von HIV-infizierten Patienten<sup>119-121</sup>. Vor diesem Hintergrund wäre auch von Interesse, ob die beobachtete Hemmung der HIV-Replikation auch an LPL, die Memory-T-Zellen ähneln, nachvollziehbar wäre. Zudem sollte die Möglichkeit eines *in-vivo* -Modells einer anti-CD28-Stimulation überprüft werden. Hierbei dürfte die Dosisfindung ein zentrales Problem darstellen, da konzentrationsabhängig entweder eine HIV-Replikation stattfindet, oder inhibiert wird<sup>112</sup>.