

Die Depletion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch programmierte Zelltötungsmechanismen (Apoptose) ist ein wesentliches Merkmal der HIV-Infektion. Durch die Konstruktion eines rekombinanten Virusklons, welches das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, gelang es uns, produktiv HIV-infizierte Zellen (GFP<sup>+</sup>) von nichtinfizierten bzw. latent infizierten Zellen (GFP<sup>-</sup>) mit einfachen Mitteln zu unterscheiden. Die Verwendung einer Dreifarben-FACS-Analyse erlaubte die subtile Untersuchung apoptotischer, produktiv infizierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Anwesenheit autologer Makrophagen in derselben Kultur. Dabei zeigte sich, daß die

# HIV und programmierter Zelltod - Apoptoseresistenz durch Makrophagen - Ulrich Mahlknecht

Universitätskliniken Frankfurt, Abt. Hämatologie/Onkologie, Theodor-Stern-Kai 7,  
D-60590 Frankfurt

auf diese Weise den Einfluß von Nef auf in infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ablaufende Apoptosevorgänge zu untersuchen. Interessanterweise stellten wir dabei fest, daß die Anwesenheit von Makrophagen die Anzahl apoptotischer Zellen nicht zu reduzieren vermochte, wenn CD4<sup>+</sup>

ist mit einer chronischen Aktivierung des Immunsystems assoziiert. Unter den proinflammatorischen Zytokinen, welche sowohl im Plasma, als auch in den Geweben HIV-infizierter Patienten zu finden sind, spielt TNF eine zentrale Rolle (9,10) und ist möglicherweise für die Entwicklung von Kachexie und erhöhte Körpertemperaturen, wie sie bei HIV-infizierten Individuen gefunden werden können, mitverantwortlich (11). In chronisch infizierten Promonozyten und T-lymphoiden Zell-Linien steigert TNF die HIV-1-Replikation über eine NFκB-assoziierte Aktivierung des HIV-Promotors LTR (long terminal repeat) (12). Eine Aktivierung von NFκB durch TNF, welches beispielsweise im Rahmen der HIV-Infektion an der Makrophagenoberfläche exprimiert wird (13), vermittelt eine Kaskade antiapoptotischer Signale (14) und begünstigt das Auftreten eines Subsets nicht apoptotischer GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Interessanterweise vermochte die Expression von TNF-α an der Oberfläche von Makrophagen den apoptotischen Zelltod in mit einem Nef-exprimierenden Virus infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verhindern. Durch Verwendung einer CHO-Zell-Linie, welche membrangebundenes TNF exprimiert (CHO<sub>TNF</sub>-Zellen) (15), konnten wir eine Reduktion der Menge apoptotischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der HIV-infizierten Kultur im Vergleich zur nichtinfizierten Kultur um einen Faktor von 4-5 beobachten. In ähnlicher Weise war der Zelltod infolge Apoptose in mit TNF-α stimulierten Jurkat T-Zellen, welche transient mit einem Nef-exprimierenden Plasmid transfiziert worden waren, deutlich vermindert, während bei Verwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen humanes TNF die Anzahl nichtapoptotischer GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 75 % zurückging.

## ● Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, daß es in Abhängigkeit von der Expres-

Ulrich Mahlknecht, leitet eine Nachwuchsforschungsgruppe der Deutschen Forschungsgemeinschaft an der Universität Frankfurt. Medizinstudium an der Universität Tübingen, Studium der molekularen Medizin an der State University of New York. Wissenschaftliche Ausbildung bei Prof. Dr. Günther Dannecker und Prof. Dr. Dietrich Niethammer an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen in Immunologie sowie bei Prof. Dr. Richard Bucala in Molekularbiologie und Prof. Dr. Eric Verdin in molekularer Virologie in New York. Klinische Ausbildung in Innerer Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie bei Prof. Dr. Roland Mertelsmann in Freiburg und bei Prof. Dr. Dieter Hoelzer in Frankfurt. [mahlknecht@em.uni-frankfurt.de](mailto:mahlknecht@em.uni-frankfurt.de)

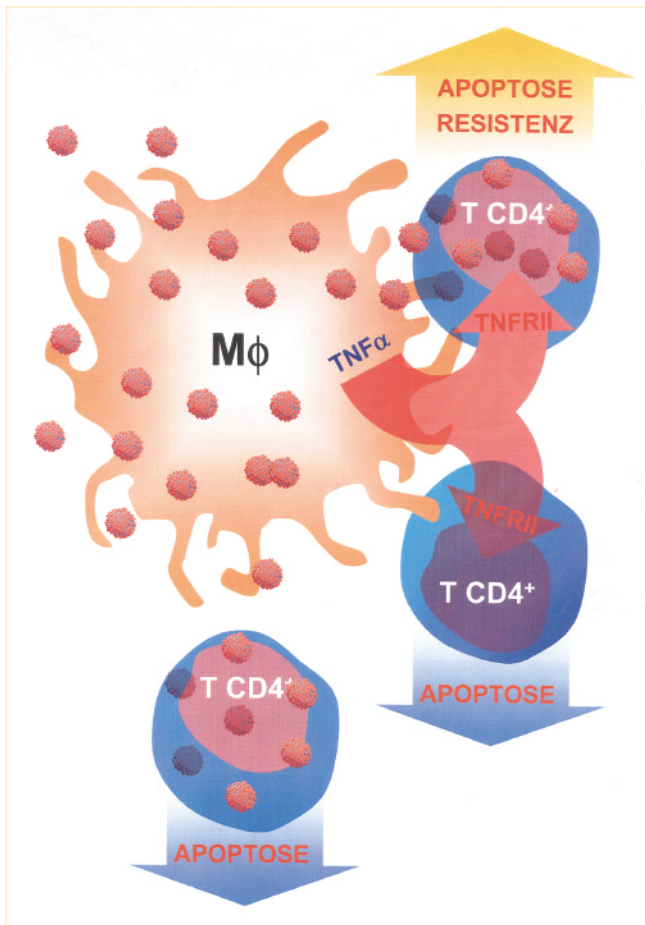


Anzahl infizierter nicht-apoptotischer, GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Anwesenheit von Makrophagen in der Kultur sehr viel höher war als in deren Abwesenheit und daß direkte interzelluläre Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und Lymphozyten Voraussetzung für den Nachweis dieser apoptoseresistenten T-Zellpopulation waren. Bemerkenswerterweise zeigte die auf diese Weise identifizierte apoptose-resistente GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population nur eine ausgesprochen geringe Expression des Oberflächenmoleküls CD4.

In einer vor einiger Zeit publizierten Studie hatten wir ein GFP-exprimierendes HIV-Reporterviruskonstrukt verwendet, bei dem das Nef-Gen deletiert war (HIV-GFPΔNef). Mit Hilfe dieses Konstrukts konnten wir in infizierten Zellen ablaufende Apoptosevorgänge vom Zelltod nichtinfizierter T-Zellen unterscheiden (1). Da inzwischen mehrere Forschungsgruppen zeigen konnten, daß das Nef-Protein für das Fortschreiten der HIV-Erkrankung essentiell ist (2,3), haben wir in der vorliegenden Studie ein GFP-exprimierendes HIV-1-Viruskonstrukt generiert bei dem das Nef-Gen intakt war (HIV-GFP), um

T-Zellen mit dem HIV-GFPΔNef Konstrukt infiziert wurden. Hieraus konnten wir schließen, daß der Nachweis apoptoseresistenter GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der Anwesenheit des HIV-Proteins Nef abhängt. HIV-Nef ist ein Protein, welches früh während der HIV-Infektion gebildet wird und für eine Reihe voneinander unabhängiger funktioneller Aktivitäten verantwortlich gemacht wird, welche Replikation und Überleben des Virus innerhalb infizierter Zellen sichern und damit die Ausbreitung des Virus in vivo begünstigen (4), beispielsweise durch die Herunterregulation von CD4 und von MHC-Klasse I-Molekülen an der Zelloberfläche, was potentiell infizierte Zellen vor einem Angriff durch zytotoxische T-Zellen (CTL) schützt und deren Infektiosität erhöht (5-7). In einer unlängst veröffentlichten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die Expression von Nef in Makrophagen durch die Sekretion von C-C-Chemokinen letztlich ruhende T-Zellen aktiviert und für eine kontinuierliche Ausbreitung der Infektion rekrutiert (8).

Eine dysregulierte Zytokinproduktion gehört zu den wesentlichen Merkmalen der AIDS-Erkrankung und



**Abbildung 1:** Während HIV-infizierte T-Zellen nach Stimulation durch TNF gegenüber apoptoseinduzierenden Signalen resistent sind, sind infizierte T-Zellen, bei denen eine direkte Wechselwirkung mit TNF-exprimierenden Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen) ausgeblieben ist, vor Apoptose nicht geschützt.

sion des HIV-Proteins Nef und einer über die Makrophagenoberfläche vermittelten Aktivierung durch TNF eine Population produktiv HIV-infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen gibt, welche gegenüber Apoptose resistent ist. Die Apoptoseresi-

Diese Zellen werden dadurch für eine Nef-assoziierte Apoptoseinduktion empfänglicher. Eine Verbesserung des Verständnisses der Mechanismen, welche dem Überleben infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen zugrundeliegt, stellt einen poten-

tiellen Weg für neue therapeutische Ansätze dar, welche die Beseitigung von Virusreservoirs in HIV-infizierten Individuen zum Ziele hat.

### ● **Danksagung**

Diese Studien wurden in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Georges Herbein an der University of Texas Medical Branch in Galveston, Texas durchgeführt und durch Mittel der American Foundation for AIDS Research und der National Institutes of Health sowie teilweise durch Sachmittel der Gisela-Stadelmann-Stiftung und der August-Scheidel-Stiftung gefördert.

### ● **LITERATUR**

1. Herbein G et al. J Virol 72, 660, 1998
2. Kestler H et al. Cell 65, 651, 1991
3. Jamieson BD et al. J Virol 68, 3478, 1994
4. Ross TM et al. Curr Biol 9, 613, 1999
5. Aiken C et al. Cell 76, 853, 1994
6. Schwartz OV et al. Nat Med 2, 338, 1996
7. Kestler HD et al. Cell 65, 651, 1991
8. Swingle SA et al. Nat Med 5, 997, 1999
9. Fauci AS et al. Science 262, 1011, 1993
10. Merrill JE et al. J Virol 63, 4404, 1989
11. Ladhevirta J et al. Am J Med 85, 289, 1988
12. Duh EJ et al. Proc. Natl Acad Sci USA 86, 5974, 1989
13. Herbein G et al. Nature 395, 189, 1998
14. Liu ZG et al. Cell 87, 565, 1996
15. Grell ME et al. Cell 83, 793, 1995