

Untersuchungen der Resistenzmechanismen der
Afrikanischen Grünen Meerkatze gegenüber dem
simianen Immundefizienzvirus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Silke Holzammer

Frankfurt 2000

1. EINLEITUNG	1
1.1. HIV-INFEKTION UND DAS KRANKHEITSBILD AIDS.....	1
1.2. HIV UND SIV.....	2
1.2.1. Genomstruktur und Morphologie.....	2
1.2.2. Lebenszyklus von Immundefizienzviren.....	3
1.2.3. Phylogenetik und Systematik der Primatenlentiviren.....	5
1.3. HIV UND IMMUNANTWORT.....	7
1.3.1. Humorale Immunantwort.....	7
1.3.2. Zelluläre Immunabwehr.....	9
1.4. PATHOGENESE DER HIV/SIV-INFEKTION.....	10
1.5. IMPFSTOFFE GEGEN HIV.....	12
1.5.1. Primaten-Tiermodelle und SIV.....	12
1.5.2. Nicht-replizierende Impfstoffe.....	13
1.5.3. Replizierende Impfstoffe.....	14
1.6. APATHOGENITÄT VON LENTIVIREN AM MODELL DER AFRIKANISCHEN GRÜNEN MEERKATZE	15
1.6.1. Immunantwort.....	15
1.6.2. Variabilität von SIVagm in vivo.....	16
1.6.3. Lymphokine.....	16
1.6.4. Virusbelastung.....	17
1.6.5. Lymphknoten.....	17
1.6.6. Pathogenitätspotential.....	18
1.6.7. Hypothetisches Modell für die Apathogenität von SIVagm in seinem natürlichen Wirt	18
1.7. ZIELSETZUNG.....	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	21
2.1.1. Zellkultur.....	21
2.1.1.1. Zellen und Medien.....	21
2.1.1.2. Lymphozytenseparation, Plasma- und Serumisolierung.....	21
2.1.1.3. Lymphozytenproliferationskapazität.....	22
2.2. ZELASSOZIIERTE VIRUSBELASTUNG.....	23
2.2.1. Virustitration.....	23
2.2.2. IPA.....	23
2.3. MOLEKULARBIOLOGIE.....	24
2.3.1. Methoden zum Nachweis der Plasmavirusbelastung.....	24
2.3.1.1. 5'-Nuklease-PERT-Assay.....	24
2.3.1.1.1. Aufbereitung der Proben.....	25
2.3.1.1.2 Durchführung.....	25
2.3.1.1.3. Auswertung.....	26
2.3.1.2.1. Herstellung der Standards.....	27
2.3.1.2.2. Isolierung retroviraler RNA.....	28
2.3.1.2.3. Durchführung.....	28
2.3.1.2.4. Auswertung.....	29
2.3.2. Methode zum Nachweis der Provirusbelastung.....	30
2.3.2.1. DNA-Isolierung.....	30

2.3.2.2. Durchführung.....	31
2.3.3. Herstellung einer DIG-markierten SIVagm-spezifischen RNA-Sonde für die ISH	31
2.3.3.1. Klonierung von DNA	32
2.3.3.1.1. PCR.....	32
2.3.3.1.2. Restriktionsverdau von DNA.....	32
2.3.3.1.3. Ligation und Transformation	33
2.3.3.2. In-vitro-Transkription mit SP6- und T7-RNA Polymerase.....	34
2.3.3.3. Dot-blot-Test zur Semiquantifizierung der Markierungseffizienz.....	34
2.4. ÜBERPRÜFUNG DER HUMORALEN IMMUNANTWORT	34
2.4.1. Nachweis von SIV-Antikörpern mittels ELISA	34
2.4.2. Nachweis von Gag-spezifischen Antikörpern mittels ELISA.....	35
2.5. ÜBERPRÜFUNG DER UNSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT	36
2.5.1. Komplementbindungsreaktion von SIVagm ex vivo.....	36
2.5.1.1. Virusopsonisierung.....	36
2.5.1.2. Antigen-capture-assay	36
2.6. FACS-ANALYSE ZUR BESTIMMUNG DER CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, HLA-DR- UND CD25 ⁺ - ZELLEN.....	36
2.7. PROTEINCHEMISCHE VERFAHREN	37
2.7.1. Herstellung von Gag-Protein mittels affinitätschromatographischer Aufreinigung...	37
2.7.2. Western-Blot-Analyse.....	37
2.7.3. Nikaido-Färbung	38
2.7.4. BCA-Protein-Test.....	38
2.8. HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	38
2.8.1. Behandlung der entnommenen Lymphknoten.....	38
2.8.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	39
2.8.3. Immunhistochemischer Nachweis Follikulär Dendritischer Zellen	39
2.8.4. Immunhistochemischer Nachweis von SIVagm-positiven Zellen in Lymphknoten.....	40
2.8.5. In-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis viraler SIV-RNA	40
2.8.5.1. Entparaffinierung der Lymphknotenschnitte.....	41
2.8.5.2. Denaturierung	41
2.8.5.3. Acetylierung.....	41
2.8.5.4. Prähybridisierung	41
2.8.5.5. Hybridisierung	41
2.8.5.6. RNA-Verdau und stringentes Waschen.....	42
2.8.5.7. Immunhistochemische Detektion.....	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1. TETANUSSTUDIE.....	43
3.1.1. Leukozyten-bzw. Lymphozytenwerte SIVagm-infizierter AGM unter Einfluß einer Immunstimulation.....	43
3.1.2. Nachweis der Lymphozytenproliferationskapazität.....	44
3.1.3. FACS-Analyse zur Ermittlung der CD3 ⁺ -CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ -, CD25 ⁺ - und HLA-DR ⁺ - Zellen	45
3.1.4. Bestimmung der zellassozierten Virusbelastung	46
3.1.5. Messung der retroviralen RT-Aktivität mittels 5'-Nuklease-PERT-Assay zum Nachweis der Plasmavirusbelastung.....	48
3.1.6. Ausgang der Immunstimulationsstudie	49

3.2. GAG-STUDIE	50
3.2.1. Immunisierungs- und Belastungsschema	50
3.2.2. Herstellung und Testung des zur Immunisierung verwendeten Gag-Proteins.....	51
3.2.3. Messung der Antikörper gegen Gag- bzw. Env-Protein zur Überprüfung der humoralen Immunantwort.....	51
3.2.4. Bestimmung der zellassozierten Virusbelastung mittels Virustitration	53
3.2.5. Bestimmung der Provirusbelastung.....	54
3.2.6. Etablierung einer SIVagm-spezifischen TaqMan-RT-PCR.....	55
3.2.7. Bestimmung der Plasmavirusbelastung	56
3.2.8. Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde zum Nachweis von SIVagm-RNA in Lymphknoten mittels ISH.....	58
3.2.9. Histologische Untersuchungen.....	59
3.2.9.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	59
3.2.9.2. Immunhistochemische Färbung von Lymphknoten zum Nachweis viraler Proteine	60
3.2.9.3. In-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von SIVagm-RNA in Lymphknoten	62
3.2.9.4. Nachweis von Follikulär Dendritischen Zellen	67
3.2.9.5. Überprüfung der unspezifischen Immunantwort	68
4. DISKUSSION	69
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	87
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	109
8. DANKSAGUNG	110

1. Einleitung

Die weltweite Ausbreitung des humanen Immundefizienzvirus (HIV) hält seit seiner Entdeckung vor ca. 16 Jahren trotz intensiver Anstrengungen zur Prävention mit dramatischer Geschwindigkeit an. Die Anzahl der infizierten Menschen liegt derzeit nach Schätzungen des CDC (Centers for Disease Control and Prevention) weltweit bei 36 Millionen. Über 90% der HIV-Infizierten leben in Entwicklungsländern, vorwiegend in Afrika und Asien, wobei zunehmend Kinder und Jugendliche betroffen sind. Da die Zahl der AIDS-Toten weiter exponentiell ansteigen wird, werden die bereits heute dramatischen persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen weltweit katastrophale Auswirkungen haben.

1.1. HIV-Infektion und das Krankheitsbild AIDS

Das humane Immundefizienzvirus ist der Erreger einer Erkrankung, die Anfang der achtziger Jahre unter dem Namen AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) bekannt wurde (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Im Anschluß an eine asymptomatische Latenzphase von ca. 10-14 Jahren, resultiert die Infektion mit HIV in zerstörten lymphatischen Geweben und einem dramatischen Abfall der CD4⁺ Lymphozyten (Dalglish *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1993; Schellekens *et al.*, 1992). Die damit einhergehende Immundefizienz führt in erster Linie zu opportunistischen Infektionen und letztlich zum Tod der infizierten Personen (Bacchetti und Moss, 1989; Fauci und Lane, 1984; Stahl *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1986).

Bislang steht noch keine Therapie zur Verfügung, mittels derer eine vollständige Viruseliminierung möglich ist, jedoch haben die therapeutischen Möglichkeiten, insbesondere in den letzten drei bis vier Jahren, große Fortschritte gemacht. Durch die Entwicklung von Azidothymidin (AZT), einem Nukleosid-Analogen, das die Reverse Transkriptase, ein virales Schlüsselenzym, hemmt, stand 1987 die erste kausale Therapie zur Verfügung. Die Monotherapie mit Nukleosid-Analoga war allerdings von starken Nebenwirkungen begleitet und brachte nur kurzfristige Erfolge (Aboulker und Swart, 1993; Fischl *et al.*, 1987; Volberding *et al.*, 1990). Mit modernen Therapieansätzen aus Kombinationen von Inhibitoren der Reverse Transkriptase und der viralen Protease ist es bei einem Teil der Patienten möglich geworden, die Virusreplikation dauerhaft unter die Nachweisgrenze zu senken. In den meisten Fällen allerdings resultiert eine Unterbrechung der Therapie in einem raschen Anstieg der Plasmavirusbelastung. Somit wird deutlich, daß selbst während einer langen antiretroviralen Kombinationstherapie infektiöses Virus

persistiert. Da ein wirksamer Impfstoff noch nicht existiert, ist die Prävention die einzige Möglichkeit, eine HIV-Infektion zu verhindern.

1.2. HIV und SIV

1.2.1. Genomstruktur und Morphologie

Als Erbsubstanz besitzt das HIV zwei identische, jeweils etwa 9,7 kb große Einzelstränge RNS. Die zwei RNA-Moleküle liegen in Form einer eukaryontischen mRNA vor, d.h. mit einem 7-Methylguanin-Rest und polyadenyliertem 3'-Ende.

An beiden Enden ist die virale mRNS mit regulatorischen Sequenzen (LTR, long terminal repeats) ausgestattet. Diese sind für die Initiation und Termination der Transkription sowie für die Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNS der Wirtszelle zuständig. Weiterhin ist jede mRNS mit einer von der vorherigen Wirtszelle stammenden tRNA versehen, welche an komplementäre Basensequenzen angelagert ist und Primerfunktion besitzt.

Die Immundefizienzviren der Primaten enthalten wie alle Retroviren die drei Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* (group specific antigen) kodiert für die inneren Kernproteine, die an die virale RNA binden, und das Matrixprotein p17. Das *pol*-Gen (polymerase) enthält die Information zur Synthese der Reverse Transkriptase, der Integrase und einer Protease. Das *env*-Gen (envelope) kodiert für die Glykoproteine der Virushülle, die in die äußere Lipid-Doppelschicht integriert werden. Die Familie der Lentiviren zeichnet sich durch die essentiellen regulatorischen Gene *tat* und *rev* aus, die an der Regulation der RNA-Transkription, des Spleißens und am Export der viralen mRNA aus dem Nukleus beteiligt sind. Bei den Primaten-Lentiviren sind vier weitere akzessorische Gene vorhanden, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* bei HIV-1, während letzteres bei HIV-2 und SIV durch *vpx* ersetzt ist. Diese akzessorischen Gene nehmen *in vivo* Einfluss auf die Replikationsfähigkeit (Greene, 1991; Haseltine, 1991), sind aber für die *in vitro* Replikationsfähigkeit nicht notwendig. Dem Nef-Protein wird eine entscheidende Rolle für die Replikation und Pathogenität, sowie vielfältige Funktionen in der Immunmodulation zugeschrieben (Trono, 1995). Das *vif*-Gen kodiert für einen „virion infectivity factor“, der die Infektiösität des Virus steigert (Cann und Karn, 1989). Das *vpr*-Gen sorgt u.a. für den Transport des sogenannten Präintegrationskomplexes (virale DNA nach reverser Transkription, komplexiert mit Proteinen) in den Kern (Heinzinger *et al.*, 1994) und transaktiviert eine Reihe verschiedener zellulärer Gene (Refaeli *et al.*, 1995). Das *vpu*-Gen (viral protein out) kodiert für ein Protein mit

hydrophobem aminoterminalen Bereich, welcher für die Einlagerung in das zytoplasmatische Retikulum sorgt. Das Protein verbessert die Fähigkeit des Virus die Wirtszelle zu verlassen (Klimkait *et al.*, 1990). Das vpx-Gen (viral protein x) ist wichtig für die Virusvermehrung in sich nicht-teilenden Zellen wie Makrophagen und spielt eine Rolle beim Transport des Präintegrationskomplexes in den Kern (

Wie alle Retroviren haben reife HIV-Partikel einen Durchmesser von etwa 110 nm (Frank *et al.*, 1978) und sind von einer Lipid-Doppelmembran umgeben, welche sie von der Wirtszellplasmamembran übernommen haben. Die glykosylierten Hüllproteine, die als Trimere vorliegen (Lu *et al.*, 1995), sind in diese Lipid-Doppelschicht eingebettet und elektronenmikroskopisch als Spikes sichtbar (Gelderblom *et al.*, 1987). Das Hüllprotein besteht aus zwei Untereinheiten, dem externen Glykoprotein SU (gp 120) und dem Transmembranprotein TM (gp41). Sie sind durch nicht-kovalente Bindung miteinander assoziiert.

Die aus dem Matrixprotein p17 bestehende äußere, ikosaedrische Proteinhülle grenzt an die Lipid-Membran und ist mit dem TM des Hüllproteins verbunden. Das Nukleokapsid, die innere konische Proteinhülle, wird aus dem Hauptprotein des Gag (p24) gebildet. Die endgültige, reife Form entsteht erst nach dem Ausknospen. Im Inneren des Nukleokapsids liegt das virale Genom, bestehend aus zwei identischen RNA-Molekülen positiver Polarität.

Eng assoziiert mit einer als Primer fungierenden tRNA und einigen Molekülen der Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase, liegt die genomische RNA als Ribonucleokomplex vor. Weiterhin sind im Kernbereich kleine Gag-Proteine und einige virale, akzessorische regulatorische Proteine enthalten (Gelderblom, 1991).

1.2.2. Lebenszyklus von Immundefizienzviren

Mit der Anheftung des HIV an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle beginnt die Infektion. Dabei kommt es zu einer hochaffinen Wechselwirkung zwischen dem viralen Glykoprotein (gp120) und dem CD4-Rezeptor der Zielzelle. Es handelt sich dabei in erster Linie um T-Lymphozyten, aber auch um Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Mikrogliazellen (Clapham *et al.*, 1991; Dalgleish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984).

Unter Mitwirkung des Transmembranproteins gp41 von HIV kommt es zur Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran (Doyle *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 1987; McCune *et al.*, 1988; Moore

und Ho, 1993; Moore und Nara, 1991). Zusätzlich zum primären CD4-Rezeptor dienen bestimmte Chemokin-Rezeptoren der Familie der CC- bzw. CXC-Rezeptoren als essentielle Ko-Rezeptoren für HIV (Alkhatib *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Die Verwendung unterschiedlicher Ko-Rezeptoren bestimmt den Tropismus der unterschiedlichen HIV-Stämme. Insbesondere in der kritischen frühen Phase der HIV-Infektion existieren vorwiegend Makrophagen-trope Viren, d.h. CCR5-Rezeptor-trope, die in der späteren symptomatischen Phase der Infektion ihren Phänotyp zu T-Zell-tropen Virusstämmen hin verändern (Gartner *et al.*, 1986). Es werden dann bevorzugt Zielzellen infiziert, die den Ko-Rezeptor CXCR4 (Fusin) exprimieren (Feng *et al.*, 1996; Koyanagi *et al.*, 1987). Die physiologischen Liganden des CCR5-Rezeptors sind die β -Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β (D'Souza und Harden, 1996). Diese drei Chemokine werden von CD8-Zellen sezerniert und sind *in vitro* in der Lage, die Expression von HIV zu inhibieren (Cocchi *et al.*, 1995). Weitere, dem CCR5-Rezeptor ähnliche Rezeptoren wie CCR2b und CCR3 wurden bislang identifiziert (Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996).

Das Nukleokapsid gelangt durch die Rezeptor-vermittelte Infektion ins Zytoplasma der Zielzelle und nach „uncoating“ werden die virale RNA und Enzyme, welche zur Initiation der Replikation und Integration notwendig sind, freigesetzt. Die virale RNA wird unter Verwendung der als Primer dienenden tRNA von der viruseigenen Reverse Transkriptase (RT), einer RNA abhängigen DNA-Polymerase, in DNA umgeschrieben (Morrow *et al.*, 1994). Die reverse Transkription ist sehr fehlerbehaftet, da kein „proof reading“ erfolgt und trägt somit zur Variabilität von HIV bei (Preston *et al.*, 1988). Anschließend kommt es durch die RNaseH-Aktivität der trifunktionellen RT zur Hydrolyse des RNA-Stranges der Heteroduplex und nachfolgend durch DNA-Polymerase Aktivität zur Kompletierung des DNA-Einzelstranges zum Provirus. Nach Transport der DNA-Doppelhelix in den Wirtszellkern erfolgt mittels Integrase die Integration in das Wirtsgenom. Im Wirtsgenom liegt die provirale DNA flankiert von regulatorischen Kontrollsequenzen vor, die unter dem Begriff LTR zusammengefasst sind. Man unterteilt die LTR in die Regionen U3, R und R5, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen. Das Provirus wird dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt, hängt vom Aktivierungszustand der Zelle ab (Stevenson *et al.*, 1990). Im Falle einer T-Zell-Aktivierung kommt es zur Transkription der integrierten DNA und nachfolgend zur Translation der viralen RNA. Hierbei werden über 30 verschiedene RNA-Spezies aus der viralen 9 kb RNA durch differenzielles Spleißen gebildet (Luukkonen *et al.*, 1995). Dabei entstehen unter anderem virale

mRNA-Moleküle, die für die essenziellen regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Tat und Rev regulieren die Bildung von Vollängen-RNA und einfach gespleißter RNA. Die Vollängen-RNA dient entweder als genomische RNA, welche in neue Viruspartikel verpackt wird oder als mRNA zur Translation von Gag- und Pol-Vorläuferproteinen. Für die Gene *env* und *vif*, *vpr*, *vpu* dient einfach gespleißte mRNA. Mit Hilfe der viralen Protease werden die viralen Gag- und Pol- Vorläuferproteine in die einzelnen, funktionellen Proteine gespalten. Das Env-Vorläuferprotein wird aus einer gespleißten viralen mRNA synthetisiert. Die Selbstaggregation der viralen Proteine zu neuen Viruspartikeln erfolgt an der Zellmembran. Als Erbinformation für einen neuen Infektionszyklus wird ungespleißte Vollängen-mRNA in das Viruspartikel verpackt und die neugebildeten Viren knospen aus der Wirtszelle aus („budding“).

1.2.3. Phylogenetik und Systematik der Primatenlentiviren

HIV und SIV gehören zur Gattung der Lentiviren, welche zur Familie der Retroviridae zählen. Die humanen Lentiviren werden in zwei Gruppen eingeteilt, HIV-1 und HIV-2, die in Sequenzvergleichen ca. 55% Homologie zueinander aufweisen (Guyader *et al.*, 1987).

Der Mensch ist nicht der natürliche Wirt von HIV-1 oder HIV-2, sondern wurde durch eine Transspezies-Transmission mit dem Virus infiziert.

Bislang konnte bei 26 verschiedenen afrikanischen Primatenspezies eine Infektion mit simianen Immundefizienzviren nachgewiesen werden. Mindestens 18 dieser bekannten Primaten-Lentiviren infizieren ihren Wirt natürlich, d.h. die in ihrem natürlichen Habitat lebenden Tiere sind Träger des Virus. Unumstritten ist heute, daß afrikanische Primaten ein extrem großes Reservoir an Lentiviren beherbergen, welche großes Potential besitzen andere Spezies, insbesondere den Menschen, zu infizieren. Zwei dieser Viren, SIVcpz von Schimpansen und SIVsm von grauen Halsbandmangaben fungieren als Verursacher von AIDS in Menschen.

Derzeit teilt man Primaten-Lentiviren in fünf Hauptgruppen ein:

1. SIVcpz von Schimpansen (*Pan troglodytes*) + HIV-1
2. SIVsm von grauen Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*) + HIV-2 + SIVmac von Rhesusaffen
3. SIVagm von Afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus*)
4. SIVsyk von Sykes` monkeys (*Cercopithecus albogularis*)

5. SIV_{lhoest} von von lHoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) + SIV_{sun} von sun-tailed monkeys (*Cercopithecus solatus*) + SIV_{mand} von Mandrillen (*Mandrillus sphinx*)

Auffällig ist, daß die Homologie der verschiedenen SIV innerhalb einer Primatenspezies am größten ist, d.h. SIV bildet wirtsspezifische Kluster innerhalb des Evolutionszweiges. Dies spricht dafür, daß die Infektion vor sehr langer Zeit stattgefunden hat. Die Evolution von SIV lief wirtsabhängig ab, d.h. die Differenzierung der SIV-Subspezies ging einher mit der Differenzierung der Primaten. Als Beispiel soll hier die Ko-Evolution der Afrikanischen Grünen Meerkatze und SIV_{agm} gezeigt werden.

Man unterteilt die AGM in vier Hauptspezies: *Chlorocebus sabeus* (West-Afrika), *C. tantalus* (Zentralafrika), *C. pygerythrus* (Ost-Afrika) und *C. aethiops* (Ost-Süd-Afrika). Die geographische Verbreitung dieser vier Gruppen ist sehr groß und nicht überlappend. Alle Gruppen sind mit hoher Prävalenz mit SIV_{agm} infiziert (Allan *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 1994). Die Viren jeder Spezies formieren vier verschiedene Kluster, die jedoch untereinander eine wesentlich größere Homologie aufweisen, verglichen mit jeder anderen SIV-Spezies. Vieles spricht dafür, daß diese Cluster-Bildung wirtsspezifisch und nicht geographisch bedingt ist. Vergleicht man beispielsweise SIV_{agm}_{vervet} aus Ost-Afrika stammend mit SIV_{agm}_{vervet} aus Süd-Afrika, findet sich eine deutlich größere Verwandtschaft, als mit SIV_{agm}_{grivet} in geographischer Nähe, d.h. Ost-Afrika (Jin *et al.*, 1994). Wahrscheinlich wurde der gemeinsame Vorläufer der AGM-Subspezies mit dem gemeinsamen Vorläufer der SIV_{agm}-Subspezies infiziert bevor die Differenzierung stattfand und somit vollzog sich eine Ko-Evolution von Wirt und Virus.

Diese wirtsabhängige Virus-Evolution wird auch für andere Primaten-Lentiviren wie SIV_{cpz} und SIV_{lhoest} angenommen (Bibollet-Ruche *et al.*, 2000; Corbet *et al.*, 2000; Dutrillaux *et al.*, 1988; Gao *et al.*, 1999; Vanden Haesevelde *et al.*, 1996).

Prinzipiell kann sich eine Kreuzspezies-Transmission von Primaten-Lentiviren in einer großen Vielfalt im neuen Wirt manifestieren. Das Spektrum reicht dabei von unbemerkten Infektionen bis hin zu Epidemien. Die SIV_{sm}-Infektion von Rhesusaffen und Schweinsaffen resultiert beispielsweise in einer AIDS-Erkrankung (Hirsch *et al.*, 1989; Letvin *et al.*, 1985).

Die HIV-Infektion des Menschen resultiert ebenfalls aus einer Kreuzspezies-Transmission. Die genetische Homologie von SIV_{cpz} und HIV-1 spricht dafür, daß SIV_{cpz} der Ursprung des humanen Immundefizienzvirus ist. Es ist davon auszugehen, daß der Schimpanse (*Pan*

troglydites troglydites) der natürliche Wirt von SIVcpz ist und das Virus auf dem Weg der Jagd auf den Menschen übertragen wurde (Gao *et al.*, 1999). Allerdings müssen noch mehr infizierte Tiere in freier Wildbahn gefunden werden um eine eindeutige Aussage zu treffen.

Die Genomorganisation zeigt nur in HIV-1 und SIVcpz das akzessorische Gen *vpu* (Huet *et al.*, 1990). Basierend auf genetischen Analysen des Hüllproteins Env wird bei HIV-1 eine Hauptgruppe M und eine Gruppe O für Außenseiter unterschieden, wobei sich die Hauptgruppe M wiederum in 10 Subtypen (A-J) gliedert (Myers *et al.*, 1994). In Europa und USA ist der HIV Subtyp B prävalent, während der Subtyp E in Afrika und Subtyp C in Indien überwiegt. Eine neue, aus Kamerun stammende Gruppe N wurde inzwischen identifiziert (Simon *et al.*, 1998). HIV-2 ist hauptsächlich in Westafrika endemisch und wird in 5 Subtypen (A-E) unterteilt (Myers *et al.*, 1994).

Sehr vieles spricht dafür, daß der Mensch kutan oder mukosal mit infektiösem Tierblut in Kontakt trat (Gao *et al.*, 1999). Das Jagen, Schlachten und der Verzehr von rohem Fleisch infizierter Tiere ist in Afrika gängige Praxis und stellt somit eine plausible Transmissionsroute dar. Der direkte Kontakt von Menschen mit infizierten Sooty mangabeys und Schimpansen könnte so in einer Transspezies-Transmission resultieren.

Für die anschließende Ausbreitung des Virus werden verschiedene Gründe angenommen. Unter anderem könnten die sozialen, ökonomischen und gesellschaftlichen Änderungen im frühen und mittleren 20. Jahrhundert den Grundstein für eine AIDS-Epidemie gelegt haben.

1.3. HIV und Immunantwort

1.3.1. Humorale Immunantwort

Innerhalb der ersten vier Monate nach Infektion mit HIV kommt es zur Bildung spezifischer Antikörper. Diese sind hauptsächlich gegen verschiedene Epitope der Strukturproteine Gag und Env von HIV gerichtet. Darunter befinden sich auch Virus-neutralisierende Antikörper (Moore und Nara, 1991; Robert-Guroff *et al.*, 1985; Weiss *et al.*, 1985), welche *in vitro* in der Lage sind, die Infektion von CD4-Zellen mit HIV-Laborstämmen zu verhindern. Dies geschieht, indem sie an das Hauptneutralisationsepitop von HIV-1, den V3-Loop im Hüllprotein gp120, binden. Einer effizienten Virusneutralisation steht allerdings entgegen, daß das Virus eine hohe Mutationsrate aufweist (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988) und somit ständig neue Phänotypen mit veränderten Epitopen entstehen (Sharp *et al.*, 1994; Verani *et al.*, 1993). Der V3-Loop des gp120

liegt genau in einem solchen Bereich (Javaherian *et al.*, 1989; Palker *et al.*, 1988; Rusche *et al.*, 1988) und ist somit diesem Teil der Immunantwort nicht mehr zugänglich. Diese neuen Virustypen werden auch als Fluchtmutanten bezeichnet (Albert *et al.*, 1990; McKeating *et al.*, 1989; Nara *et al.*, 1990; Reitz *et al.*, 1988).

In der asymptomatischen Phase sind Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar (Burton und Montefiori, 1997). Auch für Env-spezifische Antikörper konnte eine infektionsverstärkende Wirkung aufgezeigt werden (Fust *et al.*, 1995). Man kennt dieses Phänomen auch von anderen retroviralen Infektionen in verschiedenen Tiermodellen, wie Pferden, Katzen und Affen (Mitchell *et al.*, 1995; Montalero *et al.*, 1996; Siebelink *et al.*, 1995).

Infizierte Zellen und von einer Lipidhülle umgebene Viruspartikel können durch Aktivierung der Komplementkaskade zerstört werden. Diese Virolyse kann direkt durch das Komplementsystem oder unter Vermittlung von Antikörpern erfolgen (Sissons und Oldstone, 1980). Dieser Teil der Immunantwort ist allerdings bei HIV-Infizierten nur schwach ausgeprägt (Lyerly *et al.*, 1987; Norley und Kurth, 1992; Spear *et al.*, 1990; Toth *et al.*, 1991). Bei HIV liegen entsprechende Antikörper-Bindungsstellen im viralen Hüllprotein, insbesondere im Transmembranbereich gp41 (Marschang *et al.*, 1997). Obwohl alle getesteten HIV-Stämme *in vitro* eine Komplementaktivierung in Patientenseren induzieren (Spear *et al.*, 1990; Stoiber *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1996), scheint HIV *in vivo* eine Resistenz gegen die lytische Attacke aufzuweisen (Banapour *et al.*, 1986; Dierich *et al.*, 1996). Möglicherweise bietet die Integration bestimmter zellulärer Membranproteine wie CD46, CD55 und CD59 in die Hülle dem Virus Schutz vor Angriff des Komplementsystems (Marschang *et al.*, 1995; Montefiori *et al.*, 1994; Saifuddin *et al.*, 1995). Nebenbei konnte auch eine infektionsverstärkende Wirkung der Virolysevermittelnden Antikörper gezeigt werden (June *et al.*, 1991). Die Bindung von Komplementfaktoren an HIV-Ko-Rezeptoren kann die Infektion verschiedener Zelltypen erleichtern.

Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytolyse ist früh im Verlauf der Infektion *in vitro* nachweisbar und besitzt breite Spezifität (Ljunggren *et al.*, 1989; Norley *et al.*, 1990b). Eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) beruht auf der Bindung der variablen Region von Antikörpern an die Oberfläche von Virus-infizierten Zellen, worauf die Fc-Region dieser Antikörper von spezialisierten Killerzellen erkannt wird, welche die infizierten Zellen durch Perforation der Membran und DNA-Abbau zerstören (Yagita *et al.*, 1992). Dieser

Mechanismus spielt bei anderen viralen Erkrankungen, wie Masern und Herpes, eine entscheidende Rolle (Balachandran *et al.*, 1982; Forthal *et al.*, 1993). Die Bedeutung bei einer HIV-Infektion ist allerdings noch nicht geklärt.

1.3.2. Zelluläre Immunabwehr

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) spielen bei der Bekämpfung viraler Infektionen eine entscheidende Rolle (Rouse *et al.*, 1988). CTL erkennen exprimierte virale Proteine nur im Komplex mit körpereigenen Molekülen des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (Braciale *et al.*, 1987). Es handelt sich bei CTL um CD8-T-Lymphozyten. Der T-Zell-Rezeptor der CD8-Zellen bindet an den Peptid/MHC-Komplex, es findet eine Aktivierung der CTL statt und schließlich kann die infizierte Zelle zerstört werden. CTL sind in der Regel MHC-Klasse I restringiert. Die Anwesenheit von CD4-Helfer-Zellen ist in den meisten Fällen zur Aktivierung der CTL-Vorläuferzellen notwendig (Nabholz und MacDonald, 1983).

Bei der HIV-Infektion treten spezifische CTL früh auf, d.h. schon innerhalb einer Woche nach Exposition (Reimann *et al.*, 1994; Yasutomi *et al.*, 1993). Dieser Zeitpunkt korreliert mit einem drastischen Abfall der primären Virämie, sowohl im Plasma als auch in den PBMC (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Safrit *et al.*, 1994). Die CTL-Antwort gegen HIV ist in der akuten und der asymptomatischen Phase stark ausgeprägt (Hoffenbach *et al.*, 1989; Venet *et al.*, 1992). CTL können dabei in vielen verschiedenen Geweben wie Blut, Lunge, Milz, Gehirn und Lymphgewebe nachgewiesen werden (Hadida *et al.*, 1992; Jassoy *et al.*, 1992; Plata *et al.*, 1987; Walker und Plata, 1990). CTL-Aktivität wurde hauptsächlich gegen die viralen Proteine Gag, Pol, Env und Nef nachgewiesen, aber auch gegen die regulatorischen Proteine Vif, Tat und Rev (Riviere *et al.*, 1994). Bekannt sind mittlerweile mehr als 300 Epitope von HIV mit den entsprechenden MHC-I-Typen. Obwohl diese Epitope in zum Teil stark konservierten Bereichen der Virusproteine liegen (Norley *et al.*, 1993), ist noch nicht geklärt, weshalb eine vollständige Eliminierung der HIV-infizierten Zellen durch die CTL nicht erreicht wird. Ungeklärt ist, ob CTL das Virus kontrollieren können. Bei *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, daß die CTL-vermittelte Lyse der Zielzellen trotz des schnellen Replikationszyklus von sechs Stunden schnell genug erfolgt, um die Produktion neuer Virionen zu verhindern (Yang *et al.*, 1996). Für eine Beteiligung der CTL an der Kontrolle der Infektion spricht weiterhin der Nachweis HIV-spezifischer CTL-Aktivität bei Personen, die häufiger Virusexposition ausgesetzt sind und trotzdem uninfiziert bleiben (highly exposed but uninfected, EU). Diese Personen zeigen keine

spezifische humorale Immunantwort im Plasma (Langlade-Demoyen *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 1995; Rowland-Jones *et al.*, 1995). Allerdings konnten virusspezifische IgA an der Oberfläche der Mukosa gefunden werden (Devito *et al.*, 2000)

Neben der lytischen antiviralen Aktivität besitzen CTL einen weiteren, nicht MHC-restringierten Mechanismus. CD8-Zellen sekretieren Faktoren, die sich inhibierend auf die Virusreplikation auswirken und außer beim Menschen (Mackewicz und Levy, 1992) auch bei Primaten untersucht wurden (Emau *et al.*, 1991; Ennen *et al.*, 1994a; Ennen *et al.*, 1994b; Kannagi *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 1993). Zunächst konnten die drei β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1- β , und RANTES identifiziert werden (Cocchi *et al.*, 1995). Deren zellulärer Rezeptor (CCR5) wird von makrophagen-tropen HIV-Stämmen als Ko-Rezeptor genutzt (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, daß IL-16 die Replikation von HIV und SIV in infizierten PBMC inhibiert (Baier *et al.*, 1995). In verschiedenen Studien wurden relative hohe Konzentrationen dieser Faktoren bei LTNP gemessen (Brinchmann *et al.*, 1990). Trotzdem ist davon auszugehen, daß auch andere Mechanismen bzw. Faktoren, bei der Inhibition beteiligt sind, die noch nicht vollständig identifiziert wurden (Clerici *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1997).

Bekannt ist, daß bei Eintritt in die symptomatische Phase der HIV-Infektion die CTL-Antwort absinkt und schließlich verschwindet (Carmichael *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1995).

1.4. Pathogenese der HIV/SIV-Infektion

Nachdem das HIV in den Wirt eingedrungen ist und sich in das Genom integriert hat, ist die Infektion durch den Verlauf dreier Phasen gekennzeichnet. In der akuten Phase, der virämischen Phase, die etwa 2-6 Wochen anhält, kommt es meist zu Grippe-ähnlichen Symptomen, sie kann aber auch subklinisch verlaufen (Cooper *et al.*, 1985). Die Virusbelastung im Blut zeigt etwa zwei Wochen nach Infektion einen hohen Anstieg. Die zellassoziierte Virusbelastung liegt bei 10^2 - 10^4 infizierten Zellen/Millionen PBMC, die Plasmavirusbelastung bei 10^5 - 10^8 Partikeln/ml Plasma. Parallel dazu kann das Virus schon sehr früh in den Lymphknoten nachgewiesen werden und breitet sich schnell im gesamten lymphatischen Gewebe aus (Pantaleo *et al.*, 1998). Während dieser Zeit kommt es zu einem deutlichen Abfall der CD4-Zellzahlen, die nach der akuten Phase wieder leicht ansteigen (Clark *et al.*, 1991; Graziosi und Pantaleo, 1998; Reimann *et al.*, 1994).

In der asymptomatischen Phase fällt nach Einsetzen der antiviralen Immunantwort die Virusbelastung wieder ab und bleibt oft für Jahre auf einem niedrigen Niveau von 10⁴-bis 10⁵ Partikeln pro ml Plasma bestehen (Mellors *et al.*, 1996). Die Anzahl der HIV-RNA Kopien ca. 6-12 Monate nach Infektion, die individuell unterschiedlich ist, erlaubt eine relativ präzise Voraussage der weiteren Krankheitsprogression (Katzenstein *et al.*, 1997; Mellors *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum peripheren Blut bleibt die Virusbelastung in den lymphatischen Organen auch während der asymptomatischen Phase hoch und steigt sogar beständig an (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993). Große Virusmengen werden in Antikörper-Komplexen an die Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) der Lymphknoten gebunden. Simultan kommt es zu einem Absinken der CD4-Zellzahl. Während der initialen Infektionsphase steht HIV ein nahezu unlimitiertes Kontingent an Zielzellen zur Verfügung. Die Virusvermehrung steigt an, da jedes freigesetzte Virion im Durchschnitt mehr als ein Nachkommen produziert. Die Fortpflanzungsrate von HIV sinkt mit dem Absinken der CD4-Zellzahl auf unter 1. Es stellt sich ein sehr dynamisches Gleichgewicht (steady state) zwischen Virusproduktion und Elimination ein. Pro Tag werden von einem infizierten Patienten in der asymptomatischen Phase, in der die Virusbelastung stabil ist, etwa 10¹⁰ Viren produziert und vom Immunsystem eliminiert. Infiziert werden dabei hauptsächlich CD4⁺-Zellen, die zu 99% an der Virusreplikation beteiligt sind. Ihre Halbwertszeit liegt bei 1,6 Tagen, diejenige freier Viruspartikel im Plasma bei sechs Stunden (Ho *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1997; Perelson *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1995). Daraus resultiert eine Erhöhung des gesamten CD4-Zellumsatzes um den Faktor 25 (Ho *et al.*, 1995). Der enorme Zellumsatz ist wahrscheinlich mitverantwortlich für den graduellen Verlust der Aktivierung des Immunsystems, insbesondere der Helferzellen. In jüngster Zeit gibt es allerdings verstärkt Hinweise darauf, daß eine persistierende Hyperaktivierung des Immunsystems verantwortlich ist für den Verlust der CD4⁺-Zellen. Diese Aktivierung ist anhand verschiedener Leukozyten-Aktivierungsmarker und der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine messbar (Hazenberg *et al.*, 2000b). Die Funktionen dieser Immunzellen, die normalerweise eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Regulation des Immunsystems spielen, sind dadurch stark beeinträchtigt (Gruters *et al.*, 1990). Die T-Helferzellen exprimieren in diesem Stadium Lymphokine, die die Replikation von HIV fördern. Zusätzlich verschiebt sich die Präferenz von HIV offenbar in Richtung der Th2-Subpopulation, deren Aktivierung wiederum ein, die humorale Immunantwort stimulierendes, Zytokinprofil bewirkt. Die zelluläre Immunantwort wird immer stärker geschwächt und es kommt nach durchschnittlich 8-10 Jahren

zum Beginn der symptomatischen Phase (Copeland *et al.*, 1996; Pantaleo und Fauci, 1994). Etwa 10% der Infizierten zeigen eine besonders schnelle Krankheitsprogression (RP, rapid progressors), 5% hingegen gehören zu den Langzeitüberlebenden (LTNP, long terminal non progressors) (Graziosi und Pantaleo, 1998). Die symptomatische Phase ist gekennzeichnet durch einen starken Anstieg der Virusbelastung, einen dramatischen Abfall der CD4-Zellzahl bis weit unter 200 Zellen/ μ l und dem gleichzeitigen Absinken der Zellzahl des Blutes, bis unter die Nachweisgrenze. Aufgrund der hohen Virusreplikation in diesem Stadium, bei immer weniger zur Verfügung stehenden Wirtszellen, werden scheinbar Virusvarianten mit erweitertem Wirtszellspektrum selektiert, die sich wahrscheinlich über die Verwendung verschiedener Ko-Rezeptoren neue Wirtszellpopulationen zugänglich machen.

In dieser Phase erkranken AIDS-Patienten an opportunistischen Infektionen, beispielsweise *Pneumocystis carinii* Pneumoniae (PCP), *Candida albicans* Infektionen des Mund-, Rachen- und Bronchialraumes, Tuberkulose sowie Herpes zoster (Levy, 1993). Normalerweise apathogene, ubiquitär vorkommende Krankheitserreger können nicht mehr adäquat bekämpft werden, opportunistische wie nicht opportunistische Krankheitserreger führen letztlich zum Tod.

1.5. Impfstoffe gegen HIV

1.5.1. Primaten-Tiermodelle und SIV

Bis zum Ende des letzten Jahrzehnts waren nach Schätzung der WHO, trotz umfangreicher Aufklärungskampagnen, weltweit mehr als 35 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Es ist trotz aller wissenschaftlichen Bemühungen bis heute nicht möglich, eine vollständige Heilung zu erreichen oder einen Impfschutz zu erzielen. Die Dreifach-Kombinationstherapie brachte zwar eine deutliche Verbesserung des Gesundheitszustandes der Patienten, jedoch setzen sich auch hierbei resistente HI-Viren durch. Die Erforschung eines effizienten, sicheren, kostengünstig produzierbaren und gut handhabbaren Impfstoffs gegen HIV ist deshalb dringend notwendig. Nicht nur für die Entwicklung und Erprobung von Impfstoffen gegen HIV werden vergleichbare Tiermodelle benötigt (Daniel *et al.*, 1990; Kurth *et al.*, 1988) sondern auch zur Erforschung der Pathogenese und den Ursachen des Infektionsverlaufs von HIV (Levy, 1996; Schultz und Hu, 1993). Die humanen und simianen Immundefizienzviren besitzen ähnliche Genomorganisation, Morphologie und spezifischen Zelltropismus. Als Primärrezeptor fungiert in beiden Fällen das CD4-Molekül (Clapham *et al.*, 1991) und auch der Ko-Rezeptor CCR5 ist bei Makrophagen-

tropen HIV-Stämmen und SIV identisch (Alkhatib *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996).

Die Pathologie von SIVmac in infizierten Rhesusaffen ist mit derjenigen HIV-infizierter Menschen vergleichbar (Gardner *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1994), jedoch bezüglich der Krankheitsprogression deutlich schneller. In diesem Wirt verursacht SIV ein halbes bis drei Jahre nach der Infektion eine schwere Immundefizienz (simianes AIDS) mit der charakteristischen Verminderung der CD4-T-Helferzellen, opportunistischen Infektionen und letalem Ausgang. Aus diesem Grund wird ein beträchtlicher Teil der Immunisierungsstudien in diesem Makaken-Modell durchgeführt (Norley und Kurth, 1997; Schultz und Stott, 1994). Als apathogenes Tiermodell steht neben der SIVagm Infektion in AGM, die SIVsm Infektion in Sooty manabeys zur Verfügung.

1.5.2. Nicht-replizierende Impfstoffe

Zu den nicht-replizierenden Impfstoffen zählen unter anderem inaktiviertes Gesamtvirus und Virusproteine. Obwohl erste Erfolge bei der Erlangung eines Infektionsschutzes gegen SIV durch Immunisierung von Rhesusaffen mit inaktiviertem SIV erzielt wurden (Murphey-Corb *et al.*, 1989), ist der Einsatz als Impfstoff im Menschen prinzipiell sehr umstritten. Aufgrund der Gefahr einer unvollständigen Inaktivierung wäre die Verwendung sehr riskant (Ennen *et al.*, 1992). Ausserdem zeigten weitere Studien nicht den gewünschten Erfolg.

Der Vorteil viraler Struktur- und Nichtstrukturproteine liegt darin, daß hier kein komplettes Virusgenom vorliegt und somit ein Infektionsrisiko ausgeschlossen werden kann. Allerdings wird bei dieser Immunisierungsstrategie häufig nur die humorale Immunantwort angesprochen, die in der Regel nicht in der Lage ist, einen Impfschutz zu erzielen, insbesondere, wenn sich sogenannte Fluchtmutanten gebildet haben. Die Stimulation von CTL konnte dagegen mit der Verwendung von synthetischen Peptiden in Kombination mit Adjuvantien erreicht werden (Sastry und Arlinghaus, 1991). In Studien mit Rhesusaffen, die mit Multiepitop-Peptiden immunisiert wurden, sind die Tiere zwar vor Infektion nicht geschützt, sie weisen aber eine geringere Virusbelastung auf und zeigen auch zwei Jahre nach Infektion keine Krankheitssymptome. Die Verwendung von Peptiden bietet zwar die Möglichkeit gezielt Epitope von HIV einzusetzen um CTL zu stimulieren, der Einsatz ist aber sehr schwierig, da für jedes zu immunisierende Individuum sowohl der MHC-I-Genotyp, als auch das bindende CTL-Epitop bestimmt werden müssen.

1.5.3. Replizierende Impfstoffe

Der Vorteil von attenuierten Viren ist, daß diese die Induktion aller Abwehrmechanismen, inklusive der CTL-Antwort, wie im Verlauf einer natürlichen Infektion bewirken. Allerdings persistieren die Impfviren lebenslang als Provirus integriert im Genom, wobei neben dem Risiko einer Integrationsmutagenese auch die Gefahr einer Rückmutation zum pathogenen Wildtypvirus besteht. Die Anwendung von attenuierten HIV ist zur Zeit nicht durchführbar. Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz von attenuiertem Lebendimpfstoff (SIV) in neugeborenen Rhesusaffen eine schnelle Krankheitsprogression und auch in adulten Rhesusaffen eine langsame Krankheitsprogression induzierte (Baba *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 1999).

Durch den Einsatz von rekombinanten apathogenen Viren zur intrazellulären Expression von HIV-bzw. SIV-Proteinen läßt sich, wie bei allen Lebendimpfstoffen, eine starke zelluläre Immunantwort induzieren (Natuk *et al.*, 1992; Natuk *et al.*, 1993; Prevec *et al.*, 1991). Für diesen Zweck sind bereits mehrere verschiedene Viren als Vektoren zur Expression unterschiedlicher Fremdproteine eingesetzt worden, wie Vaccinia-Viren (Cox *et al.*, 1993; Gotch *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1991), Adenoviren (Dewar *et al.*, 1989), Polioviren (Evans *et al.*, 1989), Rhinoviren (Arnold *et al.*, 1994) oder auch rekombinante Salmonellen (Aldovini und Young, 1991; Berggren *et al.*, 1995). Der Vorteil rekombinanter Viren als Vektoren liegt im Ausschluß der möglichen Revertierung zum HIV-Wildtyp sowie dem Ausschluß einer Integrationsmutagenese, die Retroviren aufgrund ihres Lebenszyklus beinhalten. Die humorale Immunantwort gegen HIV ist bei solchen rekombinanten Lebendimpfstoffen eher schwach (Graham *et al.*, 1992), weshalb anschließend meist noch zusätzlich mit Virusuntereinheiten immunisiert wird. Mit dieser Kombinationsstrategie unter Verwendung rekombinanter Vaccinia-Viren konnte bereits ein Impfschutz bei Rhesusaffen, Cynomolgen und Schimpansen erzielt werden (Girard *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992, Hu *et al.*, 1993, Hu *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996).

Eine weitere Möglichkeit stellen die DNA-Impfstoffe dar. Der Vorteil der Nukleinsäure-Immunisierung liegt darin, daß sich jedes gewünschte Gen dem Immunsystem endogen über MHC-I präsentieren läßt. Da es hierbei zu einer endogenen Prozessierung der Antigene kommt, läßt sich der zelluläre Arm der Immunantwort aktivieren. Die injizierte DNA wird durch einen noch unbekanntem Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen und gelangt in den Zellkern, wo sie transkribiert und im Zytosol translatiert wird. Bei den im SIV/Affen-Tiermodell

durchgeführten DNA-Immunisierungen konnte neben einer humoralen auch eine starke spezifische CTL-Antwort induziert werden (Fuller *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Shiver *et al.*, 1995; Yasutomi *et al.*, 1996). Bei Schimpansen konnte nach einer Immunisierung mit DNA-Plasmiden zur Expression von HIV-1-Env ein Schutz vor nachfolgender Belastung mit einem schwach replizierenden HIV-1 erzielt werden (Boyer *et al.*, 1997). Makaken, die mit HIV-1-env DNA-Expressionsplasmiden immunisiert wurden, waren nach Belastung mit einem chimären infektiösen SHIV-Stamm, ein rekombinantes, chimäres Virus, zum Teil (Boyer *et al.*, 1996) bzw. bei zusätzlicher Immunisierung mit HIV-1-env-Protein zur Verstärkung der humoralen Immunantwort ganz vor einer Infektion mit SHIV geschützt (Letvin *et al.*, 1997). Barouch *et al.* (Barouch *et al.*, 2000) konnten zeigen, daß der Einsatz von IL-2/Ig-Plasmiden in Kombination mit HIV-1 und SIV-DNA-Impfstoffen die humorale und zelluläre Immunantwort in höheren Primaten deutlich verstärkt.

1.6. Apathogenität von Lentiviren am Modell der Afrikanischen Grünen Meerkatze

Der natürliche Wirt von SIV erkrankt zeitlebens nicht an einer Immundefizienz. Die Entschlüsselung der Mechanismen, die dieser benignen chronischen Infektion zu Grunde liegen, sind für das Verständnis der pathogen verlaufenden lentiviralen Infektionen, insbesondere der HIV-Infektion des Menschen, von immenser Bedeutung. Große Anstrengungen wurden deshalb innerhalb der letzten zehn Jahre unternommen, um Unterschiede im Verlauf einer pathogenen und apathogenen Infektion festzumachen. Ein wichtiges Modell ist die Afrikanische Grüne Meerkatze (AGM). Verschiedene mögliche Ursachen wurden dabei in der Vergangenheit untersucht. Es zeigte sich, daß das SIV_{agm}/AGM System der HIV-1-Infektion des Menschen am ähnlichsten ist.

1.6.1. Immunantwort

Ein möglicher Grund für die Apathogenität von SIV_{agm} im natürlichen Wirt könnte eine qualitativ oder quantitativ andere Immunkontrolle sein. Es hat sich aber gezeigt, daß der Immunstatus SIV_{agm}-infizierter AGM vergleichbar oder sogar schwächer ist, als derjenige HIV-infizierter Menschen. Die HIV-1-Infektion des Menschen ist charakterisiert durch eine starke zytotoxische T-Lymphozyten-Aktivität und eine starke Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, aber durch eine relativ schwache Bildung neutralisierender Antikörper und ohne detektierbare Komplement-aktivierte Antikörper-Antwort. Aus diesem Grund wurden diese Immunparameter auch bei natürlich und artifiziell infizierten AGM bestimmt. Dabei konnte

gezeigt werden, daß es zwar zur Bildung von Antikörpern kommt, welche ADCC-Lyse vermitteln, es konnten aber keine Komplement-aktivierenden Antikörper gefunden werden. Hingegen konnten in natürlich infizierten Wildfängen Virusstamm-spezifische neutralisierende Antikörper detektiert werden (Gicheru *et al.*, 1999). Aufgrund technischer Probleme ist der Nachweis antiviraler CTL schwierig, es kann aber nicht davon ausgegangen werden, daß die CTL-Antwort stärker ist, als die HIV-Infizierter. Es ist aufgrund dieser Datenlage nicht anzunehmen, daß eine starke, spezifische Immunantwort verantwortlich für den Schutz vor Erkrankung ist (Norley, 1996).

Ein interessantes Phänomen ist das Ausbleiben einer Antikörperbildung gegen das nicht-denaturierte Kernprotein (Gag) im natürlichen Wirt. Im Gegensatz zu HIV-infizierten Menschen und SIVmac infizierten Rhesusaffen und der SIVagm-Infektion im heterologen Wirt (*M. nemestrina*) kommt es nach Infektion der AGM mit SIVagm nicht zur Bildung von Gag-Antikörpern. Sera von natürlich-infizierten AGM, die mittels ELISA auf ihre Reaktion gegen lysiertes Virus getestet wurden, zeigten hohe Titer gegen virale Strukturproteine. Diese Reaktion war hingegen sehr niedrig bzw. nicht detektierbar, wenn als Antigen gereinigtes Gag-Protein eingesetzt wurde (Norley *et al.*, 1990a). Im Gegensatz dazu konnten bei mit dem selben Virus infizierten *M. nemestrina* hohe Titer gegen Gesamtvirus und Gag-Protein nachgewiesen werden. Die Ursache dafür bzw. die Auswirkungen auf den Infektionsverlauf, sind bislang nicht geklärt.

1.6.2. Variabilität von SIVagm in vivo

Die außerordentlich hohe HIV-Variabilität wurde oft in Zusammenhang gebracht mit der Krankheitsentwicklung in vivo. HIV könnte so der Immunantwort entgehen und bliebe somit unkontrolliert. Die *in vivo* Variabilität von SIVagm ist mit HIV-1 vergleichbar. Es konnte eine Mutationsrate von 7,7 Mutationen pro Kilobase pro Jahr detektiert werden (Baier *et al.*, 1991). Die Mutationsrate und Frequenz defekter Proviren ist kaum niedriger als die von HIV-1 und kann daher nicht für die Apathogenität in Betracht gezogen werden.

1.6.3. Lymphokine

Es konnte gezeigt werden, daß die CD8-Zellen HIV-infizierter Menschen einen löslichen Faktor produzieren, welcher die HIV-Replikation in CD4-Zellen inhibiert (Blackbourn *et al.*, 1994; Walker und Plata, 1990). Verglichen mit Menschen besitzen AGM einen hohen Prozentsatz CD8+Zellen mit einer CD4/CD8-Ratio von 0,13 (versus Mensch 2,2). Versuche haben gezeigt,

daß auch von AGM-CD8-Zellen dieser lösliche Faktor produziert wird (Ennen *et al.*, 1994a; Ennen *et al.*, 1994b). Dieser Faktor CAF (CD8 cell antiviral factor) besitzt sowohl intervirus- als auch interwirt-Spezifität. Es gibt trotz allem keinen Hinweis darauf, daß AGM-CAF effektiver ist, als der in Menschen oder Rhesusaffen produzierte Faktor.

1.6.4. Virusbelastung

Bei HIV-infizierten Menschen und SIVmac infizierten Rhesusaffen existiert eine hohe Korrelation zwischen „Viruslast-Set-point“, d.h. der durchschnittlichen Viruslast während der chronischen Phase der Infektion, und der Krankheitsprogression (Ten Haaft *et al.*, 1998).

Eine mögliche Erklärung für den apathogenen Verlauf der Virusinfektion wäre ein Mechanismus mittels dessen die Virusreplikation im Wirt auf ein nicht-pathogenes Niveau supprimiert wird.

In einem anderen apathogenen SIV-Primatenmodell (SIVsm/Sooty mangabey) konnte in einer Studie eine Virusbelastung von $4,7 \times 10^5$ - $1,2 \times 10^7$ RNA Kopien pro ml Plasma detektiert werden (Rey-Cuille *et al.*, 1998). Diese hohe Virusbelastung ist mit derjenigen HIV-Infizierter ohne Therapie vergleichbar (Piatak *et al.*, 1993) und kann somit nicht für den benignen Verlauf der Infektion in Betracht gezogen werden.

1.6.5. Lymphknoten

Während der akuten und asymptomatischen Phase einer HIV-Infektion finden sich in lymphatischen Geweben deutlich höhere Viruslasten als im peripheren Blut (Pantaleo *et al.*, 1993). Dies wird für die progressive Zerstörung des lymphatischen Gewebes im Verlauf der Infektion verantwortlich gemacht. Außerdem wurde extrazellulär assoziiertes HIV auf Follikulär Dendritischen Zellen, sogenanntes „Virus trapping“, in Lymphknoten gefunden (Embretson *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1994). Vermutlich ist diese Beladung der FDC mit Viruspartikeln verantwortlich für die nachfolgende Apoptose.

Im Gegensatz zu HIV-Infizierten und SIVmac-infizierten Rhesusaffen (Baroni *et al.*, 1990; Baskin *et al.*, 1995) bleiben Lymphknoten SIVagm-infizierter AGM während der gesamten Infektionszeit intakt und zeigen keine Zerstörung der Architektur. Weder mittels In-situ-Hybridisierung noch mittels Immunhistochemie konnte ein Trapping von Virus oder viralen Antigenen auf Follikulär Dendritischen Zellen in den Lymphknoten nachgewiesen werden.

Die von CD4⁺-Zellen exprimierte, infektiöse Virusbelastung in den Lymphknoten SIVagm-infizierter AGM ist deutlich niedriger als die Provirusbelastung im peripheren Blut. Die Provirusbelastung in beiden Kompartimenten ist vergleichbar (Beer *et al.*, 1996).

Es findet sich also hier ein deutlicher Unterschied zu HIV-infizierten Menschen.

1.6.6. Pathogenitätspotential

Bei einem Virus wie SIVagm stellt sich die Frage, ob es sich um ein per se apathogenes Retrovirus handelt, welches sich im Lauf von Millionen Jahren der Ko-Evolution als harmlose aber sehr erfolgreiche Form an seinen Wirt adaptiert hat. Da aber SIVagm im heterologen Wirt, der *M. nemestrina*, Krankheit induzieren kann (Hirsch *et al.*, 1995), ist davon auszugehen, daß für den Ausbruch der Krankheit sowohl virale als auch wirtsabhängige Faktoren verantwortlich sind. Der pathogene SIVagm-Klon stammte aus einer natürlich infizierten AGM und war in der Lage, ein AIDS-ähnliches Syndrom, d.h. eine charakteristische frühe Virämie, Thrombozytopenie, lymphoide Depletion, opportunistische Infektionen und Meningoenzephalitis in *M. nemestrina* zu induzieren. Innerhalb eines Jahres starben fünf der acht Versuchstiere. Mit Hilfe eines daraus abstammenden Klons (SIVagm9063) konnte die Krankheitsinduktion in *Makaka nemestrina* reproduziert werden. Im Gegensatz dazu konnte mit demselben Klon weder in AGM noch in Rhesusaffen ein AIDS-ähnliches Syndrom induziert werden. Auffällig war weiterhin, daß die Virusbelastung sowohl im Plasma als auch in den PBMC und im Gewebe hier sehr viel niedriger war als bei *M. nemestrina*.

Auch für das apathogene SIVsm/Sooty mangabey-System konnte gezeigt werden, daß es sich bei SIVsm nicht um ein per se apathogenes Virus handelt, sondern daß dieses in der Lage ist, in *M. nemestrina* ein deutliches Absinken der CD4⁺-Zellen zu verursachen (Johnson *et al.*, 1990). Putkonen *et al.* (Putkonen *et al.*, 1989) konnten zeigen, daß eine SIVsm-Infektion in *M. fascicularis* SAIDS induziert und vergleichbar ist mit der HIV-Infektion von Menschen.

1.6.7. Hypothetisches Modell für die Apathogenität von SIVagm in seinem natürlichen Wirt

Vergleicht man das benigne SIVagm/AGM-Modell mit der pathogenen HIV-Infektion des Menschen so werden zwei Unterschiede deutlich. Der erste und signifikanteste Unterschied ist das Fehlen von Virus-Trapping in den Lymphknoten von AGM, ungeachtet des hohen Niveaus von zirkulierendem Virus. Dies könnte die dauerhaft intakte Lymphknotenarchitektur während der Infektion erklären. Der zweite, kuriosere Unterschied ist das Fehlen einer Immunantwort

gegen nicht-denaturiertes Gag-Protein, im Gegensatz zu einer starken Immunantwort gegen Env-Protein. Vorausgesetzt diese beiden Phänomene wären miteinander assoziiert, könnte folgendes Modell in Betracht gezogen werden:

Während der HIV-Infektion des Menschen kommt es zur Lyse vieler infizierter Zellen, bevor die Formation intakter Viruspartikel abgeschlossen ist. Somit werden Viruspartikel, bestehend aus Kernprotein und sowohl RNA als auch RT haltig, freigesetzt. Dies könnte die enorme Diskrepanz zwischen mittels RT-PCR oder PERT gemessenen Viruspartikeln und der Zahl infektiöser Partikel erklären. Diese Kernpartikel würden rasch von Gag-Antikörpern erkannt und komplexiert. Während der Passage durch die Lymphknoten könnten sie via Fc-Rezeptor an der Oberfläche von Follikulär Dendritischen Zellen getrappt werden und könnten so nachfolgend durch inadäquate Immunreaktion oder Zytokindysregulation zu einer Zerstörung der Lymphknotenarchitektur führen. Tatsache ist, daß hohe Mengen viraler RNA mittels In-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Tatsache ist auch, daß es nachfolgend zur Zerstörung der Lymphknotenarchitektur bzw. zu einem Absterben von Follikulär Dendritischen Zellen kommt, wobei dieses reversibel ist, d.h. bei adäquater Therapie und Sinken der Virusbelastung bilden sich die Follikulär Dendritischen Zellen neu.

Im Falle der AGM kommt es ebenfalls zur Bildung von Viruspartikeln: Aufgrund der nicht vorhandenen Gag-Antikörper könnten diese aber nicht komplexiert bzw. auch nicht in Lymphknoten an die Oberfläche von FDC geheftet werden, und somit fände keine Zerstörung der Lymphknotenarchitektur statt (Norley *et al.*, 1999).

Es ist weiterhin an dieser Stelle zu erwähnen, daß in allen natürlichen, apathogenen SIV/Primaten-Modellen die Abwesenheit oder nur eine schwache Immunantwort gegen Gag-Protein detektiert werden konnte (Emau *et al.*, 1991; Fultz *et al.*, 1990; Norley *et al.*, 1990a; Rey-Cuille *et al.*, 1998; Tsujimoto *et al.*, 1988).

1.7. Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit, der Tetanusstudie, soll der Einfluß einer exogenen Antigen-Stimulation mittels Recall-Antigen (Tetanustoxoid) auf die Virusbelastung von SIVagm-infizierten AGM getestet werden. Untersucht werden soll dabei, ob die Virusreplikation SIVagm-positiver AGM einem immunologischen Kontrollmechanismus unterliegt. Folgende Hypothese ist Grundlage dieser Studie:

Nach Antigen-spezifischer Immunstimulation kommt es zur Proliferation von Gedächtniszellen, d.h. CD4+-T-Zellen, also den Zielzellen von SIV und nachfolgend zu einem Anstieg der Virusbelastung. Dieser erfolgt transient und wird rasch auf den Ausgangswert reguliert.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluß von Gag-Antikörpern auf die Viruslast in Lymphknoten bzw. den Infektionsverlauf von SIVagm in seinem natürlichen Wirt untersucht werden. Insbesondere die Fähigkeit, Viruspartikel auf der Oberfläche von FDC in Keimzentren von Lymphknoten nach Existenz von Antikörpern gegen das Kernprotein anzuheften, soll untersucht werden. Weiterhin soll ein Testsystem etabliert werden, welches es erlaubt, die virale RNA in Plasma bzw. die Provirusbelastung in PBMC zu quantifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zellen und Medien

Für unterschiedliche Nachweisverfahren wurden C8166- Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine durch HTLV-I immortalisierte, CD4-positive T-Zelllinie. Diese Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, 10% FKS (Biother, Kelkheim), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) und NSP (Neomycin 100 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 U/ml, Sigma, Taufkirchen), im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit gehalten. Frisch isolierte Affen-PBMC wurden ebenfalls in RPMI 1640-Medium und unter gleichen atmosphärischen Bedingungen kultiviert. Alle 2-3 Tage bzw. bei Gelbverfärbung des Mediums erfolgte ein Mediumwechsel, d.h. der Überstand wurde abgenommen, die Hälfte der Zellen verworfen und frisches Medium zugegeben.

2.1.1.2. Lymphozytenseparation, Plasma- und Serumisolierung

Um periphere, mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Vollblut zu gewinnen, wurde eine Dichtezentrifugation in Ficoll (Histopaque 1077, Sigma), einer Polysaccharose der Dichte 1.077 g/l, durchgeführt. Hierzu wurden 15 ml heparinisiertes Vollblut auf die Membran eines mit 15 ml Histopaque gefüllten Leucosep-Röhrchen (Greiner) pipettiert und für 30 min bei 200 g ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Megafuge). Aufgrund ihrer höheren Dichte wandern dabei die Erythrozyten und Granulozyten durch die Membran nach unten, während die PBMC oberhalb der Membran einen weißen Ring im Plasma bilden. Mit einer Pipette wurden die PBMC aus der Interphase abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 120 g für 10 min mit Bremse). Danach wurden die Zellen in hypotoner 0,86%iger Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Hierbei lysierten die Erythrozyten, so daß sie bei anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS entfernt werden konnten. Die PBMC wurden danach in Medium aufgenommen und es wurde mittels eines automatischen Zellzählers (Coulter Counter ZM) die Zellzahl bestimmt.

Das Plasma wurde für verschiedene Nachweisverfahren weiter aufbereitet. Dazu entfernte man es oberhalb des Lymphozytenrings und zentrifugierte es bei 300 g für 30 min bei 4°C, um eventuell noch vorhandene Zellen zu pelletieren. Ein Teil des Plasmas wurde danach aliquotiert und bei -20°C weggefroren. Im Anschluß wurden jeweils 0,5 ml Plasma in 1,5 ml Sarstedt-Röhrchen abgefüllt und diese für 2h bei 4°C und 1.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgesaugt, so daß das Viruspellet für weitere Untersuchungen bei -70°C gelagert werden konnte. Das Serum wurde nach Abschluß der Blutgerinnung durch Zentrifugation bei 450 g für 20 min aus 2-3 ml Vollblut gewonnen. Zur Komplement- und Virusinaktivierung wurde das Serum infizierter Affen für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

2.1.1.3. Lymphozytenproliferationskapazität

Um die Stimulation der Zellproliferation durch Tetanustoxoid *in vitro* zu testen, wurde ein ³H-Thymidin-Einbau-Test durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Inkorporation des radioaktiv markierten Nukleotids Thymidin in neusynthetisierte DNA in antigenstimulierten Lymphozytenkulturen. Die Proliferation der Zellen kann über die Menge des eingebauten Thymidins in die DNA quantifiziert werden.

Durchführung:

Als Untersuchungsmaterial dienten frisch isolierte PBMC der AGM. Durchgeführt wurde der Test in U-well-Platten. Zuerst wurde das Tetasorbat in CG-Medium (1% Affenserum und 2mM L-Glutamin) 1:100 vorverdünnt und in drei Konzentrationsstufen vorgelegt (1:100, 1:200, 1:400).

Pro Loch wurden 100 µl verdünntes Tetasorbat in 96-U-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) vorgelegt und 1×10^5 PBMC zugegeben. Als Negativkontrolle fungierte ein Ansatz ohne Stimulanz, d.h. PBMC in CG-Medium. Hierbei wurden für jeden Affen bzw. jede Tetasorbatkonzentration vier Replikate erstellt.

Es folgte eine dreitägige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, bevor der Testansatz mit 1µCi ³H-Thymidin in 100µl Medium pro Loch gepulst wurde. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mittels eines halbautomatischen „96-well-cell-harvesters“ (Berthold, Bad Wildbach) geerntet. Dabei wurden die Zellen auf ein Filterpapier übertragen, welches im Anschluß für mehrere Stunden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet wurde. Diese wurden dann direkt in einem Szintillationscounter (Liquid Scintillation Counter, Wallac) gemessen und somit die in die DNA eingebaute Radioaktivität bestimmt. Der

Stimulationsindex ergab sich aus dem Quotienten zwischen Einbau von ^3H -Thymidin mit Tetanustoxoid und Einbau von ^3H -Thymidin ohne Tetanustoxoid.

2.2. Zellosoziierte Virusbelastung

2.2.1. Virustitration

Die Virustitration dient der Untersuchung der PBMC auf produktiv infizierte Zellen, wobei eine logarithmisch abgestufte Anzahl an PBMC mit suszeptiblen Zellen, d.h. C8166-Zellen, kokultiviert wurde.

Bei jeder Blutung der AGM, wurden je 1×10^6 , 2×10^5 , 4×10^4 , 8×10^3 , $1,6 \times 10^3$, 320, 64 und 13 Zellen in einem Volumen von 100 μl mit 1×10^6 C8166-Zellen in einem Volumen von 1 ml pro Vertiefung in jeweils 3 Replikaten kokultiviert. Durchgeföhrt wurde der Ansatz in 24-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden). Wöchentlich wurde das Medium gewechselt.

Eine Infektion der Indikatorzellen mit SIVmac bzw. SIVagm wurde nach vier Wochen mittels IPA (siehe 2.2.4.) nachgewiesen. Aus der Anzahl der Vertiefungen, die positive Zellen beinhalteten, wurde der zellosoziierte Virustiter, d.h. Anzahl infizierter Zellen pro Million, bestimmt.

2.2.2. IPA

Diese Methode wird benutzt, um die Expression viraler Proteine in Zellen und damit die Infektion von Zellkulturen nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines primären Antikörpers an virale Proteine der vorab fixierten Zellen, welcher durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper sichtbar gemacht wird. Dabei führt die enzymatische Umsetzung des Substrates zu einer Färbung der infizierten Zellen. Die entstehende Rotfärbung ist mikroskopisch auswertbar.

Durchführung:

Flachboden Mikrotiterplatten wurden mit Poly-L-Lysin (5 μg pro Loch in 100 μl Aqua dest) über Nacht im Kühlschrank inkubiert und vor Zugabe der Zellen 2 x mit PBS gewaschen.

Es wurden jeweils etwa 100 μl Suspension der zu untersuchenden Zellen pro Loch transferiert und es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C zum Sedimentieren der Zellen. Die Überstände wurden entfernt und durch Eintauchen der Platte in eiskaltes Methanol und anschließender Inkubation bei -20°C für 15 min erfolgte eine Fixation und Permeabilisierung der

Zellen. Daran schloß sich ein dreimaliges Waschen mit PBS. Danach wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit Blockierungspuffer (2% Milchpulver in PBS) abgebunden. Nach 60 min Inkubation wurde der Blockierungspuffer verworfen. Als primärer Antikörper fungierte Plasma von einem SIVagm-infizierten *Macaca nemestrina* (M. nem 170). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 in 2% Milchpulver/PBS angesetzt und es wurden 50 µl/Loch pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Platten wieder 3x gewaschen und 50 µl/Loch des sekundären Antikörpers, Peroxidase-gekoppeltes anti-Human IgG (Sigma), in einer Verdünnung von 1:1000 in 2% Milchpulver/ PBS, pipettiert. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt von 30 min bei 37°C. Die Platten wurden dann erneut gewaschen, bevor die Zugabe des Substrats (19 ml Na-Acetat 20 mM, pH5.0; 0,4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol gelöst in 1 ml DMF; 10 µl H₂O₂) in einer Menge von 50 µl/Vertiefung erfolgte. Durch die Umsetzung des Substrats kam es zu einer Rotfärbung, welche mikroskopisch auswertbar war. Somit konnten infizierte und nicht infizierte Zellen differenziert werden.

2.3. Molekularbiologie

2.3.1. Methoden zum Nachweis der Plasmavirusbelastung

2.3.1.1. 5'-Nuklease-PERT-Assay

Um die Plasmavirusbelastung SIVagm belasteter AGM zu quantifizieren, wurde im Rahmen der Tetanusstudie eine bereits etablierte Methode, der 5'-Nuklease-PERT-Assay, verwendet. Der 5'-Nuklease-PERT-Assay findet Einsatz beim quantitativen Nachweis der viralen Reverse Transkriptase und beruht auf einer Kombination aus dem „product enhanced reverse Transcriptase“-Assay (PERT) (Pyra *et al.*, 1994) und dem 5'-Nuklease-Assay (Holland *et al.*, 1991). Während der RT-Reaktion wird dabei eine konstante Menge nicht-retroviraler Bakteriophagen MS2-RNA durch die zu detektierende RT in der Plasmaprobe in cDNA umgeschrieben und in einer sich anschließenden PCR amplifiziert. Die Auswertung erfolgt mittels 5'-Nuklease-Assay. Eingesetzt wird hier eine doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde, die zu 100% an einen Bereich des Templates hybridisiert, welcher von Forward- und Reverse-Primer flankiert wird. Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein (6-Fam) und am 3'-Ende der als Quencher fungierende Fluoreszenzfarbstoff Tamra, ein Rhodaminabkömmling. Ist die Sonde intakt, d.h. liegen diese beiden in direkter Nachbarschaft zueinander, emittiert der Reporter keine Fluoreszenz, d.h. es findet ein Fluoreszenz-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET) statt. Während der PCR-Reaktion kommt es

zur Bindung der Primer bzw. zur Extension, wobei die Sonde beim Auftreffen der Taq-Polymerase durch deren 3'-5'-Exonuclease-Aktivität hydrolysiert wird. Der FRET-Effekt wird aufgehoben und FAM emittiert Fluoreszenz. Dabei ist die Emission proportional zur Anzahl der Amplikons.

2.3.1.1.1. Aufbereitung der Proben

Das Plasma der SIV-infizierten AGM wurde bei 4°C für 30 min bei 3000g zentrifugiert, anschließend jeweils 0,5 ml in Sarstedt-Röhrchen aliquotiert und für weitere 2 h bei 12.000g und 4°C pelletiert. Das Viruspellet wurde direkt nach Absaugen des Überstandes bei -70°C eingefroren.

2.3.1.1.2 Durchführung

Zur Quantifizierung des Assays wurde eine Standardreihe aus rekombinanter HIV-1-RT (Boehringer, Mannheim) von 2.000 fg bis 0,02 fg austitriert, jeweils 50 µl wurden aliquotiert und bei -70°C eingefroren; 0,02 fg entsprechen einer Aktivität von 10⁹U. Für die RT-Reaktion wurden 25 µl Reaktionsmix folgender Zusammensetzung pipettiert:

Reagenzien:	Endkonzentration/25 µl:
10 x PCR-Puffer II	1x
dNTP (10 mM)	1 mM
50 x DTT (100 mM)	2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	7,5 mM
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 U/µl
Triton X-100 (10%)	0,4%
Primer RT-1 (3 pmol/µl)	300 nM
MS 2-RNA (0,8 µg/µl)	0,32 µg

Folgender Primer (Eurogentec, Belgien) wurde für die RT-Reaktion eingesetzt:

RT-1: 5'-AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG GAA-3'

Um eventuelle Sekundärstrukturen zu beseitigen, wurden die RT-Primer und MS-2-RNA zuvor für 5 min auf 70°C erhitzt. Anschließend inkubierte dieser Ansatz für 30 min bei 37°C um ein Annealing der Primer sicherzustellen. Dann wurden jeweils 25 µl Reaktionsmix in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Perkin Elmer, Weiterstadt) vorgelegt und 5 µl der Probe (Viruspellet resuspendiert in 20 µl Wasser) bzw. 5 µl des Standards hinzugefügt.

Die RT-Reaktion erfolgte für 90 min bei 37°C, 5 min 99°C und anschließendem Abkühlen auf 4°C. Um eventuell noch vorhandene RNA mittels RNase abzubauen, wurde der Ansatz im Anschluß an die RT-Reaktion für 10 min bei 37°C inkubiert.

Für die PCR-Reaktion wurden 25µl pro Reaktionsgefäß des folgenden Reaktionsmix zugegeben:

Reagenzien:	Endkonzentration/ 50 µl:
10 x PCR-Puffer II	1x
Primer RT-1 (3 pmol/µl)	300 nM
Primer RT-2 (3 pmol/µl)	300 nM
Sonde (2 pmol/µl)	200 nM
RNase A (80 ng/µl)	0,7 ng/µl
Glycerol (50%)	8%
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,025 U/µl

Folgende Primer bzw. Sonde (Eurogentec, Belgien) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt:

RT-1: 5'-AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG GAA-3'

RT-2: 5'-TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G-3'

Sonde: 5'-F TTA GCG AGA CGC TAC CAT GGC TAT CGC Q p-3'

Die Sonde war am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern.

Die PCR-Reaktion erfolgte nach einem ersten Denaturierungsschritt für 2 min bei 95°C in 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus einer Denaturierung von 15 sec bei 95°C, Annealing und Extension bei 60°C für 2 min bestand. Die Ansätze wurden danach auf 4°C abgekühlt.

2.3.1.1.3. Auswertung

Auf eine spezielle Mikrotiterplatte des Fluoreszenzspektrometers (Titertek, Fluoroscanner II) wurden jeweils 40 µl des Reaktionsansatzes überführt und es erfolgte die Messung der emittierten Fluoreszenz. Hierbei wurden die PCR-Proben bei der Extinktionswellenlänge des Fluoreszeins von 488 nm angeregt. Die Emissionsintensität der emittierten Fluoreszenz verhält sich hierbei linear zur Anzahl vorhandener Templates der Probe. Sie wird zuerst bei einer Wellenlänge von 518 nm bestimmt und dann, um den Background des Quenchers Rhodamin als passiven internen Standard zu bestimmen, bei 582 nm. Gebildet wird der interne Standard (RQ⁺-Wert) durch Division der Emissionsintensität des Reporters durch die Emissionsintensität des Quenchers. Der interne Standard der Negativkontrolle wird gleichermaßen errechnet und als RQ⁻

-Wert bezeichnet. Der eigentliche Wert des Signals der Probe ist durch den ΔRQ -Wert definiert, welcher sich aus der Substraktion des RQ^- -Wertes von allen RQ^+ -Werten ergibt. Den statistischen Schwellenwert ΔRQ , oberhalb dessen alle Proben zu 99% als positiv anzusehen sind, erhält man durch die Multiplikation der Standardabweichung der RQ^- -Werte mit 6,965. Diese Berechnung gilt für die Bestimmung von Triplikaten. Hierbei handelt es sich um einen statistischen Wert, der sich aus den t-Verteilungswerten ergibt.

Berechnungsformeln:

$RQ^+ \text{-Wert} = \frac{\text{Emission des Reporters (Fluoreszein)}}{\text{Emission des Quenchers (Rhodamin)}}$	Proben
$RQ^- \text{-Wert} = \frac{\text{Emission des Reporters (Fluoreszein)}}{\text{Emission des Quenchers (Rhodamin)}}$	Negativkontrolle
$\Delta RQ\text{-Wert} = (RQ^+) - (RQ^-)$	
Schwellenwert $\Delta RQ = \text{Standardabweichung } RQ^- \times 6,965 \text{ (bei Triplikaten)}$	

Anhand dieser Formeln wurden die Daten ausgewertet und graphisch dargestellt. Mit Hilfe der Standardkurve der austitrierten HIV-1 RT konnte die Menge an RT in den Proben quantitativ bestimmt werden.

2.3.1.2. TaqMan-RT-PCR

Um die periphere Plasmaviruslast in SIVagm-infizierten AGM zu quantifizieren wurde eine quantitative TaqMan-RT-PCR etabliert. Bei der TaqMan-PCR handelt es sich um eine sog. „Real-time PCR“, d.h. die akkumulierenden PCR-Produkte werden während der PCR detektiert und somit wird ein Post-PCR-Detektionssystem überflüssig. Möglich wird dies durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde in Kombination mit der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Zum Prinzip des 5'-Nuklease Assay siehe Punkt 2.3.1.1.. Zur Durchführung der RT-PCR wurde der ABI PRISM 7700 Sequenz-Detektor (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

2.3.1.2.1. Herstellung der Standards

Zur Herstellung der RNA-Standards wurde vorab SIVagm in großem Maßstab produziert. Für einen Zeitraum von drei Wochen wurden 5×10^6 C8166-Zellen mit jeweils 1000 μ l Zellkulturüberstand des Klons SIVagm3 in einer 50-ml-Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) kokultiviert. Die Infektion der C8166-Zellen konnte nach dieser Zeit mittels IPA demonstriert

werden. Den infizierten Zellen wurden dann weitere 5×10^8 C8166-Zellen zugeführt und eine weitere Inkubation von drei Wochen erfolgte. Im Abstand von drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden gesplittet, bis sie insgesamt in acht 750 cm^2 Zellkulturflaschen gehalten wurden. Die Überstände wurden alle zwei Tage gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

Viruspräparation:

Etwa 3 l Zellkulturüberstand wurden, um Zelltrümmer abzutrennen, in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor 19) bei 4°C für 30 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Aus diesen Überständen wurden durch eine weitere Ultrazentrifugation für 2,5 h bei 18.000 rpm und 4°C (Rotor s.o.) Viruspartikel pelletiert. Das Viruspellet wurde über Nacht auf Eis gestellt und am nächsten Tag gesammelt. Um noch vorhandene Zellproteinverunreinigungen zu entfernen wurde das resuspendierte Viruspellet auf ein Sucrosekissen, dessen Dichte mit 1,13 g/ml etwas unter der Viruspartikeldichte liegt, geschichtet. Erneut wurde für 1 h zentrifugiert (100.000 g in Beckmann Rotor SW28 bei 4°C). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.3.1.2.2. Isolierung retroviraler RNA

Bei Detergenz-Lyse setzt Virus virale RNA frei. In Anwesenheit von chaotropen Salzen (Guanidin-HCl) bindet virale RNA selektiv an das Glassieber spezieller Zentrifugenröhrchen. Die gebundene RNA bleibt im Gegensatz zu Kontaminationen zellulärer Komponenten während der folgenden Waschschriffe gebunden. Eluiert wird mit niedrigen Salzkonzentrationen.

Eingesetzt wurde der High Pure Viral RNA Kit (Roche, Mannheim) und es wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurden 200 μl in PBS resuspendiertes Viruspellet (bzw. 200 μl Heparinplasma zur Untersuchung der Proben) eingesetzt und mit 50 μl Wasser eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bei Wellenlänge 280 nm bestimmt und aus der Ratio zwischen A_{260}/A_{280} die Reinheit ermittelt. Die Titration in RNase-freiem Wasser erfolgte von 10^2 - 10^8 RNA-Kopien pro Mililiter. Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

2.3.1.2.3. Durchführung

Durchgeführt wurde eine Ein-Schritt-RT-PCR unter zu Hilfenahme eines OneStep-RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden). Der dabei eingesetzte Enzymmix enthält zwei verschiedene rekombinante Reverse Transkriptasen, eine Moloney Murine Leukemia Virus RT, die besonders effizient bei

der Umschreibung großer Mengen RNA (mehr als 50 ng) arbeitet und eine Avian Myeloblastosis Virus RT, die optimiert wurde für sehr kleine Mengen RNA (<50 ng). Bei der für die PCR-Reaktion notwendigen HotStarTaq DNA Polymerase handelt es sich um ein Enzym, welches bei Temperaturen unter 95°C inaktiv vorliegt und erst nach Erhitzen mit der Amplifikation beginnt.

Für die RT-PCR-Reaktion wurden 40µl pro Reaktionsgefäß des folgenden Reaktionsmix zugegeben:

Reagenzien:	Endkonzentration/50 µl:
5 x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	1x
Primer AVF (3 pmol/µl)	1,5 µM
Primer AVR (3 pmol/µl)	1,5 µM
Sonde AVS (2 pmol/µl)	1 µM
dNTP Mix (10mM)	jeweils 400 µM
MgCl ₂	3 mM
rRNasin	20 U
Qiagen Enzymmix (2 µl)	-
Rox Farbstoff	0,5 µM

Folgende Primer bzw. Sonde (Eurogentec, Belgien) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt:

AVF-Primer: 5'-CAG ATG CTC GCT GGC TTG TA-3'

AVR-Primer: 5'-GCC AAC CAG GTT AGG CTA ACC-3'

AV-Sonde: 5'-F AAC ACC CAG GCT CAA GCT GGT CTC CTA GT Q p-3'

Die Sonde war am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern.

Die RT-Reaktion wurde für 30 min bei 50°C durchgeführt. Anschließend erfolgten 45 Zyklen für die PCR-Reaktion. Der erste Denaturierungsschritt dauerte 15 min bei 95°C, die folgenden Denaturierungsschritte dauerten nur 15 sec. Annealing und Extension liefen bei 60°C für 2 min.

2.3.1.2.4. Auswertung

Durchgeführt wurde die Reaktion in einem ABI PRISM 7700 Sequenz-Detektor (Applied Biosystems, Weiterstadt). Hierbei wird die initiale Kopienzahl des Templates, durch Analyse der sich aufgrund der stattfindenden Amplifikation von Zyklus zu Zyklus verändernden Fluoreszenzsignale, detektiert. Je weniger Zyklen dabei notwendig sind, um ein Fluoreszenzsignal zu generieren, desto größer ist die initiale Kopienzahl. Während der PCR-

Reaktion kommt es durch einen Laser zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Emission zwischen 500 nm und 660 nm wird alle sieben Sekunden gemessen. Das normalisierte Reportersignal (R_n) repräsentiert dabei das Fluoreszenzsignal des Reporters geteilt durch das Fluoreszenzsignal des passiven Referenzfarbstoffs. Der passive Referenzfarbstoff (Rox) ist ein Farbstoff, der die PCR-Reaktion nicht beeinflusst, sondern dient als interne Referenz anhand derer das Signal des Reporterfarbstoffs normalisiert werden kann. Diese Normalisierung ist wichtig um die well-zu-well Fluoreszenz-Fluktuationen zu korrigieren. R_n steigt proportional zur Anzahl der Amplikons während der PCR-Reaktion an, bis die Reaktion ein Plateau erreicht.

ΔR_n repräsentiert das normalisierte Reportersignal minus des Basissignals, welches in den ersten 15 Zyklen der PCR ermittelt wird. Wie R_n steigt auch ΔR_n während der PCR-Reaktion bis zum Erreichen des Plateaus an.

Der Threshold Cycle (C_T) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ein über der Baseline liegendes Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Die Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Weiterstadt) generiert eine Standardkurve anhand der C_T versus der Start-Kopienzahlen aller Standards und bestimmt anhand dessen die Start-Kopienzahlen der unbekannt Proben durch Interpolieren.

In einem PCR-System mit 100%iger Effizienz steigt der C_T -Wert mit Verdopplung der Templates um eins an.

2.3.2. Methode zum Nachweis der Provirusbelastung

Um die provirale Virusbelastung zu quantifizieren wurde eine SIVagm-spezifische quantitative TaqMan-PCR etabliert. Zum Prinzip der TaqMan-PCR siehe 2.3.1.2..

Verwendet wurden hier die gleichen Primer bzw. die gleiche Sonde wie unter Punkt 2.3.1.1.2. beschrieben. Für die Standardkurve wurde Plasmid-DNA (SIVagm3) eingesetzt. Die Konzentration des Plasmids wurde photometrisch bestimmt und es wurde anschließend durch Verdünnung eine Standardreihe hergestellt (10^2 - 10^8 Kopien pro ml).

2.3.2.1. DNA-Isolierung

Unter Verwendung eines DNA-Isolierungs-Kit (QIAamp Blood Kit, Qiagen, Hilden) wurde aus 1×10^5 PBMC, laut Protokoll des Herstellers, DNA präpariert, welche später in der PCR eingesetzt wurde. Hierbei wurden die Zellen zunächst lysiert und auf eine Silica-Membran zur Adsorption

der DNA überführt. Anschließend wurden Proteine, Salze und andere Verunreinigungen durch Waschen entfernt und die DNA konnte mit 50 µl Aqua dest eluiert werden.

2.3.2.2. Durchführung

Für die PCR-Reaktion wurden 50µl pro Reaktionsgefäß des folgenden Reaktionsmix zugegeben:

Reagenzien:	Endkonzentration/50 µl:
10 x PCR-Puffer II	1x
Primer AVF (3 pmol/µl)	1,5 µM
Primer AVR (3 pmol/µl)	1,5 µM
Sonde AVS (2 pmol/µl)	1 µM
dNTP Mix (10mM)	jeweils 400 µM
MgCl ₂	3 mM
GoldTaq-Polymerase (5U/µl)	0,025 U/µl
Rox Farbstoff	0,5 µM

Folgende Primer bzw. Sonde (Eurogentec, Belgien) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt:

AVF-Primer: 5'-CAG ATG CTC GCT GGC TTG TA-3'

AVR-Primer: 5'-GCC AAC CAG GTT AGG CTA ACC-3'

AV-Sonde: 5'-**F** AAC ACC CAG GCT CAA GCT GGT CTC CTA GT **Q** p-3'

Die Sonde war am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern.

Über 45 Zyklen wurde die PCR durchgeführt. Der erste Denaturierungsschritt erfolgte bei 95°C für 10 min, die weiteren Denaturierungsschritte nur für 15 sec. Annealing und Extension liefen bei 60°C für 1 min.

2.3.3. Herstellung einer DIG-markierten SIVagm-spezifischen RNA-Sonde für die ISH

Generiert wurde eine DIG-gelabelte, einzelsträngige RNA-Sonde definierter Länge, durch in vitro Transkription einer Template DNA, in Gegenwart von DIG-UTP. Die zu transkribierende DNA wurde vorab in die Polylinkerregion eines Transkriptionsvektors kloniert, welcher entweder einen SP6- oder T7-Promotor enthält. Nach Linearisierung der Template-DNA wurde jeweils SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase zur „run off“-Transkription eingesetzt. DIG-UTP diente dabei als Substrat und wurde während der Reaktion eingebaut. Jedes 20.-25. Nukleotid der neu synthetisierten RNA war nach erfolgter Transkription DIG markiert.

2.3.3.1. Klonierung von DNA

Laut Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) wurde aus Zellkulturüberstand virale RNA isoliert. Diese wurde unter Zuhilfenahme eines cDNA-Synthese-Kit (Pharmacia, Heidelberg) mit spezifischen Primern (s. 2.3.1.2.3.) in cDNA umgeschrieben und diente im weiteren als Template-DNA für die PCR.

2.3.3.1.1. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (Saiki *et al.*, 1985).

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurde die Amplifikation eines 139 bp großen Fragments aus der LTR-Region durchgeführt. Dabei wurden mutagenisierende Primer verwendet, um die für den Expressionvektor passenden Schnittstellen anzufügen. Der Forward-Primer trägt dabei zusätzlich zu seiner spezifischen Sequenz eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII, der Reverse-Primer eine Schnittstelle für EcoRI. Pro Reaktionsansatz wurden 1,25 U AmpliTaq-Polymerase, 5 µl 10 x PCR-Puffer II (Perkin Elmer, Weiterstadt), 200 µM dNTP (Perkin Elmer, Weiterstadt), je 15 pmol Primer (Eurogentec, Belgien), 125 mM MgCl₂, 8,25 µl 50%iges Glycerol und 100 ng Template DNA eingesetzt. Durchgeführt wurde die PCR in 45 Reaktionszyklen (2 min 95°C denaturieren, anschließend 45 Zyklen: 15 sec bei 95°C, 30 sec Annealing bei 56°C und Extension bei 72°C für 30 sec bzw. im finalen Extensionschritt für 10 min).

Die Anwesenheit amplifizierter DNA-Fragmente mit entsprechender Basenlänge wurde durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel (2% ig, FMC NuSieve 3:1 Agarose, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) ermittelt. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) laut Protokoll des Herstellers gereinigt.

2.3.3.1.2. Restriktionsverdau von DNA

Zur Ligation des entsprechenden Fragments in den Transkriptionsvektor pSPT18 bzw. pSPT19 mussten zuvor sowohl der Vektor als auch das Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Schwalbach/Ts.) geschnitten werden. Insert und Vektor wurden jeweils mit EcoRI und Hind III geschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte in

einem 30 μ l-Ansatz, bestehend aus jeweils 25 U Restriktionsenzym, EcoRI Puffer und 0,5 μ g DNA. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2 h. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit dem Vektor einer Phosphatase-Behandlung (New England Biolabs, Schwalbach/Ts.) unterzogen, um eine Selbstligation des Vektors durch Entfernung freier 5'-Phosphatgruppen zu vermeiden. Dazu wurden in den Ansatz 0,5 U Phosphatase/ μ g DNA gegeben und dieser für 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde der Insert-Ansatz auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, die Bande ausgeschnitten und mittels Qiagen-PCR-Aufreinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) laut Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Der Vektor-Ansatz wurde zur Aufreinigung des geschnittenen Vektors in einen Stratagen-Clean-up-Kit (Stratagen, Niederlande) eingesetzt.

2.3.3.1.3. Ligation und Transformation

Es wurden jeweils 2 μ l PCR-Produkt in die Transkriptionsvektor pSPT18 und pSPT19 ligiert. Angesetzt wurde der Ligationsansatz in einem Volumen von 20 μ l. Dieser enthielt 0,25 μ g Transkriptionsvektor, 1 μ l Ligase T4, 2 μ l Ligasepuffer, 14 μ l H₂O. Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht.

Für die Transformation wurden, mit β -Mercaptoethanol behandelte, kompetente Zellen aus dem TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen, Niederlande) verwendet. Dazu wurden 10 μ l des Ligationsansatzes laut Protokoll transformiert und die Bakterien im Anschluß auf LB-Platten (50 μ g/ml Ampicilin und 40 mg/ml X-gal haltig) ausgestrichen. Die Anzucht erfolgte bei 37°C im Brutschrank über Nacht. Der verwendete Vektor lies eine X-Gal-Selektion zu, aus diesem Grund konnten am nächsten Tag fünf weiße Kolonien gepickt und direkt im PCR-Screening eingesetzt werden. Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus den Insert-spezifischen Primern (je 10 pmol), 1,25 U AmpliTaq-Polymerase, 2 μ l 10 x PCR-Puffer und 200 μ M dNTP. Die Reaktionsbedingungen sind bis auf den 4 Minuten verlängerten ersten Denaturierungsschritt bei 95°C mit der zuvor beschriebenen PCR (2.3.2.1.1.) identisch. Um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhöhen, wurden die positiven Kolonien mittels Über-Nacht-Kultur weiter hochgezüchtet, um anschließend unter Verwendung eines Plasmid-Präparationskit, MN PC Kit 500 (Macherey & Nagel, Düren), die Plasmid DNA zu gewinnen. Die Methode beruht auf der alkalischen NaOH/SDS-Lyse der Bakterien und anschließender Eluierung der DNA von der Silikagel-Säule. Nach Präzipitation mit Isopropanol, Reinigung mit Ethanol und Trocknung, konnten 10 μ g der Plasmid-DNA in Form eines Pellets zum Sequenzieren an MWG-Biotech, Ebersberg geschickt werden.

2.3.3.2. *In-vitro-Transkription mit SP6- und T7-RNA Polymerase*

Die In-vitro-Transkription erfolgte laut Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim). Dabei wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 1 µg Template DNA mit NTP labeling Mix, Transkriptionspuffer, RNase-Inhibitor und SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran, wurde ein DNA-Verdau durchgeführt, um die Template-DNA zu entfernen. 20 U DNase I wurden dem Ansatz zugesetzt und es erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2M EDTA. Die Sonden wurden bei -70°C gelagert.

2.3.3.3. *Dot-blot-Test zur Semiquantifizierung der Markierungseffizienz*

Um die Markierungsausbeute zu quantifizieren, wurde ein Dot-blot-Test durchgeführt. Es wurde dabei parallel zur Verdünnungsreihe einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Verdünnungsbereich von 1 ng/ml-0,01 pg/ml), eine Verdünnungsreihe der Sonde (ausgehend von 10 µg/ml) hergestellt. Jeweils 1 µl der Verdünnungsstufe wurde auf eine Nylon-Membran aufgetragen. Die Fixierung erfolgte durch UV-Crosslinking. Daran an schloß sich die immunologische Detektion. Eingesetzt wurde dafür ein Wasch und Block-Puffer-Kit. Der Anti-DIG-AP-Antikörper wurde 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnt und die Membran 30 min inkubiert. Nach anschließendem Waschen für 2 x 15 min wurde eine Chemilumineszenz Reaktion durch Zugabe von 1 ml CSPD ready-to-use-Lösung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 15 min. Die Exposition des Röntgenfilms fand zeitgleich statt. Alle Materialien wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen.

2.4. Überprüfung der humoralen Immunantwort

2.4.1. Nachweis von SIV-Antikörpern mittels ELISA

Dieser Test dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper gegen retrovirale Proteine im Serum. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels enzymgekoppeltem Anti-Antikörper nachgewiesen wird. Das Antigen, retrovirales Protein, ist an einen Träger adsorbiert. Nachdem unspezifische Bindungsstellen abgebunden worden sind, können im Testserum vorhandene spezifische Antikörper mit dem Antigen reagieren. Durch Waschen werden ungebundene Antikörper entfernt. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wird ein sekundärer, enzym-gekoppelter Antikörper, der sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers richtet, eingesetzt. Nach Zugabe des Substrats katalysiert das

konjugierte Enzym (Peroxidase) eine Farbreaktion, welche mit Schwefelsäure gestoppt wird. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und wird photometrisch bestimmt.

Durchführung:

Zunächst wurden 96-Loch-Platten (Falcon Micro test III Probind Plate, Becton Dickinson, Heidelberg) mit 50µl des entsprechenden Antigens beschichtet und diese durch Trocknung über Nacht bei 37°C im Trockenschrank an den Boden der Platte geheftet. Die dafür optimale Menge wurde vorab mittels Checkerboard ermittelt. Das verwendete Antigen:

Gesamtvirusantigen aus lysiertem SIVagm: 0,56 µg Protein/well

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 50 µl/ Loch 2% Milchpulver in PBS abgesättigt. Nach 60 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank und anschließendem Waschen (0,05% Tween 20, 0,01% NaAzid in PBS) konnten die in Inkubationspuffer (2% Milchpulver in PBS, 0,05% Tween 20) austitrierten Seren in einem Volumen von 50 µl zugegeben werden. Zur Titration wurde von den vorab hitzeinaktivierten Seren eine Ausgangsverdünnung von 1:50 hergestellt und in Dreierstufen bis 1:3.200 titriert. Nach 30-60 min Inkubation wurden die Platten 5 x gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde anti-human IgG Peroxidase-Konjugat (γ-Ketten-spezifisch aus Ziege, Sigma) 1:1.000 verdünnt benutzt. 50 µl der Verdünnung inkubierten weitere 30 min, bevor wieder 5 x gewaschen wurde. Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die Zugabe des Substrats (5 ml PBS, pH 6,0, 5 mg OPD, Sigma, 7,5 µl H₂O₂) in einem Volumen von 50 µl. Die Farbreaktion konnte nach etwa 15 min mit 25 µl 2.5 NH₂SO₄ abgestoppt werden. Die Platten wurden dann bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Meßgerät Easy Reader EAR 400 AT (SLT-Labinstruments) ausgewertet. Für den linearen Teil der Verdünnungskurven wurde mit Hilfe linearer Regression eine Gerade ermittelt. Der Titer errechnet sich aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit dem für jeden Test sich individuell ergebenden Cutoff-Wert.

2.4.2. Nachweis von Gag-spezifischen Antikörpern mittels ELISA

Das Testprinzip ist unter 2.4.1. beschrieben.

Als Antigen fungiert affinitätschromatographisch gereinigtes, virales Gag-Protein. Die Platten wurden mit 0,04 µg Protein/well beschichtet.

2.5. Überprüfung der unspezifischen Immunantwort

2.5.1. Komplementbindungsreaktion von SIVagm ex vivo

Überprüft werden sollte die Fähigkeit von AGM-Serum SIVagm zu opsonisieren, d.h. mit der Komplementkomponente C3 zu beladen. Weiterhin sollten im Vergleich dazu heterologe Seren getestet werden.

2.5.1.1. Virusopsonisierung

Um SIVagm zu opsonisieren wurde hochkonzentrierte Virussuspension eingesetzt. Die Affenplasmen wurden zur Kompensation des EDTA 20 mM mit CaCl_2 versetzt und 1:5 mit PBS/ 1% BSA verdünnt. Jeweils 200 μl Virussuspension und Serumverdünnung wurden gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion mit 1 ml kaltem PBS. Anschließend wurde der Ansatz in Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 20.000 rpm für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert und Aliquots bei -70°C gelagert.

2.5.1.2. Antigen-capture-assay

Der Antigen-capture-assay dient der Quantifizierung von opsonisiertem Virus. Dabei wurden vorab C3-spezifische monoklonale Antikörper, d.h. anti C3c und anti C3d (Dako, Hamburg) auf ProBind-Platten immobilisiert. Eingesetzt wurden 0,25 μg Antikörper pro Loch. Nach Trocknung der Platten über Nacht bei 37°C wurden die Platten dreimal mit PBS/ 0,05% Tween gewaschen. Das opsonierte Virus wurde 1:100 in PBS/ 1% BSA verdünnt und 50 μl pro Loch aufgetragen. In Zweisritten wurde das Antigen auf der Platte in PBS/ 1% BSA titriert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 200 μl PBS/ 1% BSA pro Loch. Danach wurde gebundenes Virus lysiert, d.h. 50 μl 1%iges NP40 pro Loch zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde dann mittels ELISA (2.4.1.) quantifiziert.

2.6. FACS-Analyse zur Bestimmung der CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, HLA-DR- und CD25⁺-Zellen

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen können im FACS-Gerät (FACStar plus, Becton Dickinson, Heidelberg) mit Licht entsprechender Wellenlänge angeregt werden und emittieren Signale, die ihre numerische Erfassung ermöglichen. Gleichzeitig wird im Streulicht die Größe und Granularität der Zellen dargestellt.

Je 2×10^5 Zellen der frisch isolierten PBMC wurden in 100 μ l FACS-Puffer (PBS, 0,2% BSA und 0,1% Natriumazid) resuspendiert und mit 10 μ l eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpers inkubiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis und im Dunklen, wurden die Proben einmal mit FACS-Puffer mit 10% FKS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Zur Bestimmung der T-Zellen wurde anti CD8, CD3, CD4, HLA-DR und anti CD25 eingesetzt.

Der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Coulter counter JT, Krefeld) ermittelt, mit dem die Leukozytenzahl bestimmt wurde. Um den Anteil der Lymphozyten zu ermitteln, wurden gleichzeitig Blutausstriche (EDTA-Blut) nach Durchführung einer panoptischen Färbung nach Papenheim analysiert. Anhand des in der FACS-Analyse ermittelten prozentualen Anteils der CD-4 bzw. CD8-positiven T-Lymphozyten konnten die Absolutwerte ermittelt werden.

2.7. Proteinchemische Verfahren

2.7.1. Herstellung von Gag-Protein mittels affinitätschromatographischer Aufreinigung

Wie unter Punkt 2.3.1.2.2. beschrieben, wurde Virusstock in großem Maßstab produziert. Das Virus wurde 0,1%ig mit NP40 versetzt und 30 min bei RT inkubiert, um es vollständig zu lysieren. Anschließend mit 10 ml PBS/0,1% Tween aufgefüllt.

Eingesetzt wurde eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Heidelberg) an die vorab ein monoklonaler Antikörper gegen Gag-Protein (AG3.0) gebunden wurde. Der Antikörper wurde dazu vorab über Nacht in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO_3 , pH 8,3; 0,5 M NaCl) bei 4°C dialysiert und anschließend auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. 5 ml wurden dann mit 1g Sepharose eine weitere Nacht bei 4°C inkubiert und nach mehrfachem Waschen mit alternierendem pH-Wert und Resuspendierung in eine Säule überführt. Die 10 ml Viruslysate wurden auf die Säule gegeben, mit 10 Säulenvolumen PBS/0,1% Tween gewaschen und anschließend mit 100 mM Tris-Glycin (pH 2,3) und 0,5 M NaCl eluiert. Das Eluat wird in 2 M Tris-HCl (pH 11) neutralisiert und anschließend über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Das gewonnene Protein wurde im Antigen-Capture-Assay und in der Western-Blot-Analyse getestet.

2.7.2. Western-Blot-Analyse

Zur SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, in dem die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen erfolgte (Sambrook

und Gething, 1989). Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden die Gele aus der Apparatur genommen und 5 min in Transferpuffer (10 ml 10 x Stammlösung (30 g Tris, 144 g Glycin in 1 l H₂O), 700 ml H₂O, 200 ml Methanol) inkubiert. Danach wurde das Gel auf ein gleich großes feuchtes Filterpapier plaziert. Auf die freie Geloberfläche wurde eine Nitrozellulose-Membran gelegt und ein weiteres Filterpapier aufgelegt. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei Schwämmchen in einem Plastikgitter in die Blotkammer eingebracht. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei etwa 4°C und einer Stromstärke von 250 mA. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in 0,5% Tween 20 in PBS 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antigen-Nachweis erfolgte immunochemisch unter Verwendung eines Antiserums (SIVagm positives Serum von M. nemestrina 170) und des monoklonalen Antikörpers AG3.0 und einem PO-Konjugates (anti-Human IgG bzw. anti-mouse IgG, Sigma) und einer Diaminobenzidin-Färbung.

2.7.3. Nikaido-Färbung

Um die Reinheit des affinitätschromatographisch gewonnenen Gag-Proteins zu bestimmen wurde neben der Western-Blot-Analyse eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Plasmaprobe. Es wurden 40 µl Probe aufgetragen, eine SDS-PAGE durchgeführt und die aufgetrennten Proteine zunächst über Nacht in Lösung 1 (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/ l Coomassie G250) fixiert. Anschließend inkubierte das Gel für zwei Stunden in Lösung 2 (10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/ l Coomassie G250) und für weitere zwei Stunden in Lösung 3 (10% Essigsäure, 30 mg/ l Coomassie G250). Zum Abschluß wurde der gewünschte Färbegrad der Proteinbanden mit Lösung 4 (10% Essigsäure) eingestellt.

2.7.4. BCA-Protein-Test

Laut Protokoll des Herstellers wurde ein BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) zur Quantifizierung der Proteinmenge durchgeführt.

2.8. Histologische Untersuchungen

2.8.1. Behandlung der entnommenen Lymphknoten

Nach Entnahme wurden die Lymphknoten mit einem sterilen Skalpell zerteilt, ein Teil wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das restliche Gewebe wurde in sog. Molecular Biology Fixative (Streck Laboratories, Inc., Omaha, Nebraska) einem speziellen Fixationsmedium für die In-Situ-Hybridisierung, über einen

Zeitraum von 2 Tagen fixiert und im Anschluß mit einem Vollautomaten (Microm HMP 300) nach dem Standardprotokoll 3 eingebettet.

2.8.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine histologische Übersichtsfärbung. Der basische Farbstoff Hämatoxylin färbt saure Strukturen lilablau. Zellkern und rauhes endoplasmatisches Retikulum haben eine starke Affinität zu diesem Farbstoff wegen ihres hohen Gehalts an DNA bzw. RNA. Umgekehrt ist Eosin ein saurer Farbstoff, der basische Strukturen rot oder rosa färbt. Die meisten Eiweiße des Zytoplasmas sind basisch. Deshalb wird das Zytoplasma meist rosa gefärbt. Die Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll, wobei alle Reagenzien von der Firma Merck bezogen wurden.

2.8.3. Immunhistochemischer Nachweis Follikulär Dendritischer Zellen

Die indirekte Immunperoxidase-Färbemethode dient der Lokalisierung zellulärer Antigene. Hinsichtlich eines spezifischen Antigens können bestimmte Zelltypen differenziert werden.

Verwendet wurden Paraffinschnitte von Lymphknoten von 4 µm Dicke. Nach Entparaffinierung mit Xylol wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 0,3% H₂O₂ für 5 min blockiert. Anschließend wurden die Proben in fließendem Leitungswasser gewaschen und für 5 min in TBS überführt. Um den Einsatz monoklonaler Antikörper auf Paraffinschnitten zu ermöglichen wurden die Proben vorab für 20 min bei 500 Watt in der Mikrowelle in Antigen-Retrieval-Puffer (Dako, Hamburg) gekocht. Danach wurde wieder in TBS gewaschen und mit Schweineserum (1:5 verdünnt in PBS) blockiert. Als Primärantikörper fungierte ein monoklonaler anti-CD35 Antikörper (Dako, Hamburg) der 1:25 in TBS verdünnt wurde, wovon 100 µl pro Schnitt über Nacht bei 4°C inkubierten. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für 5 min folgte eine zweistündige Inkubation bei RT mit anti-mouse IgG-PO konjugiert (Sigma, Deisenhofen). Dieses wurde 1:300 in TBS verdünnt und es wurden wieder 100 µl pro Schnitt aufgetragen. Danach wurde dreimal für 5 min mit TBS gewaschen und mittels 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Dako, Hamburg) gefärbt. Die Färbung dauerte 4 min und wurde mit Aqua dest gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Merck) eingedeckt. Diese Dauerpräparate wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei RT gelagert.

2.8.4. Immunhistochemischer Nachweis von SIVagm-positiven Zellen in Lymphknoten

Zur Gewinnung eines Antiserums gegen SIVagm wurden Kaninchen mit 20 µg affinitätschromatographisch gereinigtem Gag-Protein in 1 ml Montanide immunisiert. Die Tiere wurden dreimal mit der gleichen Menge geboostert, bevor die Blutentnahme erfolgte und das Antiserum gewonnen wurde.

Die Durchführung erfolgt wie unter Punkt 2.6.3. beschrieben. Eingesetzt wurde als Primärantikörper das Kaninchenantiserum 3 in einer Verdünnung von 1:50 und als Sekundärantikörper anti-rabbit IgG-PO-Konjugat in einer Verdünnung von 1:500. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgt nicht über Nacht bei 4°C sondern 2 h bei RT.

2.8.5. In-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis viraler SIV-RNA

Die In-situ-Hybridisierungstechnik erlaubt die spezifische Detektion von Nukleinsäuren in morphologisch konservierten Gewebeschnitten. In Kombination mit immunhistochemischen Methoden gibt die ISH mikroskopisch Aufschluß über die Topographie der Nukleinsäuren und die Expressionsaktivität von Genen. Die Technik wurde ursprünglich 1969 von Pardue und Gall entwickelt, zu einem Zeitpunkt, als nur radioaktivmarkierte Sonden zur Verfügung standen.

Im folgenden wird die ISH mit DIG markierten Sonden zum Nachweis von SIVagm-RNA beschrieben.

Es handelt sich um eine indirekte Hybridisierungs-Methode, bei der die Sonde ein Reportermolekül enthält, welches immunhistochemisch detektiert wird. Dabei darf das Reportermolekül, in diesem Fall DIG, nicht mit der Hybridisierungsreaktion interferieren. Die DIG-labeling Methode basiert auf einem aus *Digitalis lanata* isoliertem Steroid, welches ausschließlich in dieser Pflanze vorkommt und anti-DIG Antikörper dementsprechend nur hier spezifisch binden. DIG ist über einen Spacer-Arm mit der C-5-Position des Uridin-Nukleotids verbunden. Dieses DIG-gelabelte Nukleotid wird in definierter Dichte während der in-vitro Transkription durch die T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase inkorporiert. Die während der ISH Reaktion hybridisierten Sonden werden dann mittels hochaffiner anti-Digoxigenin Antikörper, welche mit AP konjugiert sind, detektiert. Sichtbar gemacht wird diese Bindung kolorimetrisch mit NBT und BCIP.

2.8.5.1. Entparaffinierung der Lymphknotenschnitte

Um die Schnitte (Dicke 4 μm) zu Entparaffinieren und anschließend zu wässern wurden sie in Glasküvetten dreimal in Xylol inkubiert, anschließend in 100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH und aq. DEPC. Alle Schritte erfolgten bei RT und für 5 min. Die Schnitte wurden dann in PBS dreimal 5 min gewaschen.

2.8.5.2. Denaturierung

Um die Gewebeschnitte zu permeabilisieren wurden sie zunächst für 20 min in 0,2 M HCl inkubiert. Anschließend zweimal für jeweils 1 min bei RT in 2 x SSC bei RT gewaschen. Der Proteinase K-Verdau erfolgte für 15 min bei 37°C (50 mM Tris, pH= 8; 01,5 mM CaCl₂; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K; 50 ml aq. DEPC). Anschließend für jeweils 1 min bei RT in 2 x SSC bei RT gewaschen.

2.8.5.3. Acetylierung

Die Acetylierung erfolgte für 10 min bei RT (0,25% (v/v) Acetanhydrid in 0,1 M Triäthanolamin (pH 7,5)). Anschließend wurden die Schnitte für jeweils 1 min bei RT in 2 x SSC bei RT gewaschen.

2.8.5.4. Prähybridisierung

Die Schnitte wurden dann in Glasküvetten für eine Stunde bei 50°C im Prähybridisierungsmix inkubiert (50% Formamid; 4 x SSC; 2 x Denhard's Reagenz; 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hefe-RNA).

2.8.5.5. Hybridisierung

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte nicht mehr in Glasküvetten sondern die Objektträger befanden sich in einer feuchten Kammer im Hybridisierungssofen. Pro Schnitt wurden 20 μl Hybridisierungsmix (50% Formamid; 4 x SSC; 2 x Denhard's Reagenz; 10% Dextransulfat; 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hefe-RNA; 2,5 μl DIG-gelabelte Sonde) auf den Lymphknotenschnitt aufgetragen. Anschließend wurde der Schnitt mit Gel Bond Film (FMC BioProducts, Rockland, USA) abgedeckt und die Ränder mit Rubber Cement (Rexel Signa AG, Glattbrugg, Schweiz) abgedichtet. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 50°C. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst für 30 min bei RT in 2 x SSC gewaschen.

2.8.5.6. RNA-Verdau und stringentes Waschen

Dieser Schritt erfolgte um nicht oder unspezifisch gebundene RNA zu entfernen. Die Rnase-Behandlung (3 M NaCl; 1 M Tris; 0,5 M EDTA; 500 µg/ ml RnaseA) erfolgte bei 37°C für 30 min. Für jeweils 10 min wurden die Objektträger anschließend zweimal in 2 x SSC und 0,2 x SSC bei 55°C gewaschen.

2.8.5.7. Immunhistochemische Detektion

Um eine unspezifische Bindung des anti-DIG-Antikörpers zu verhindern wurden die Proben zunächst für 30 min in Blockierungspuffer gegeben, bevor das AP-Konjugat (1:500) für 2h bei RT inkubierte. Anschließend wurden die Proben zweimal für 10 min gewaschen (Maleinsäurepuffer; 0,2% Tween). Vor der kolorimetrischen Detektion wurden die Proben für 2 min in Äquilibrierungspuffer (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 9,5) inkubiert. Das NBT/BCIP-Farbreagenz (18,75 mg/ ml Nitroblautetrazoliumchlorid, 9,4 mg/ ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, Toudinsalz in 67% DMSO) inkubierte, unter mikroskopischer Kontrolle, in der Regel für ca. 2h. Die Reaktion wurde mit Stoppuffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) beendet. Eingebettet wurden die Schnitte mit Glycergel. Alle Materialien wurden von Roche, Mannheim bezogen und laut Protokoll des Herstellers verdünnt.

3. Ergebnisse

3.1. Tetanusstudie

Das pathogene Potential eines Immundefizienzvirus wird u.a. von Wirt/Virus-Interaktionen bestimmt. Bisher ist noch ungeklärt, welche Faktoren dazu beitragen, daß bei der natürlich infizierten Afrikanischen Grünen Meerkatze (AGM) keine Krankheitsentwicklung zu beobachten ist. Studien in Menschen und Tieren haben gezeigt, daß eine persistierende Immunaktivierung *in vivo* die Virusreplikation erhöhen kann und damit die Krankheitsprogression begünstigt (Bentwich *et al.*, 1995; Colebunders und Latif, 1991; Quinn, 1987). Bei HIV-infizierten Menschen konnte gezeigt werden, daß die Plasmavirämie bei Immunisierung mit Tetanustoxoid transient ansteigt (Ostrowski *et al.*, 1997). Ausgehend davon, daß die Virusreplikation, durch welchen Mechanismus auch immer, kontrolliert wird, sollte der Einfluß einer Antigen-spezifischen Immunstimulation auf die Virusreplikation bei AGM untersucht werden.

Dazu wurden vier natürlich SIVagm-infizierte AGM (F15, 38, 94, 95) zwei Jahre nach Basisimmunisierung zweimal mit 0,5 ml Tetanustoxoid (Tetasorbat) im Abstand von vier Wochen i.m. immunisiert. Die Blutentnahmen nach jeder Tetanusgabe fanden wöchentlich statt.

3.1.1. Leukozyten-bzw. Lymphozytenwerte SIVagm-infizierter AGM unter Einfluß einer Immunstimulation

Um den Einfluß einer wiederholten Tetanusimmunisierung auf die Gesamtleukozyten bzw. Lymphozytenzahl zu bestimmen, wurden diese mittels dem Blutbildmessgerät Coulter (Coulter Electronics, Krefeld) aus EDTA-Vollblut gemessen.

Die Leukozyten lagen mit Werten von 2×10^6 – 1×10^7 /ml bei allen Tieren während des gesamten Zeitraums im Normbereich (siehe Abb.1). Die Schwankungen, die alle Tiere im Verlauf der Studie zeigten, konnten als normal betrachtet werden, berücksichtigt man, wie sensitiv dieser Parameter auf Entzündungsreaktionen reagiert. Auch alle gemessenen Lymphozytenwerte bzw. die ermittelten Schwankungen waren normal. Die Lymphozyten lagen mit Werten von 1×10^6 – 5×10^6 /ml bei allen Tieren während des gesamten Zeitraums im Normbereich. Weder nach dem ersten noch dem zweiten Tetanusboost konnte ein starker Anstieg der Leuko-bzw. Lymphozytenzahlen beobachtet werden. Dies gilt für alle untersuchten AGM.

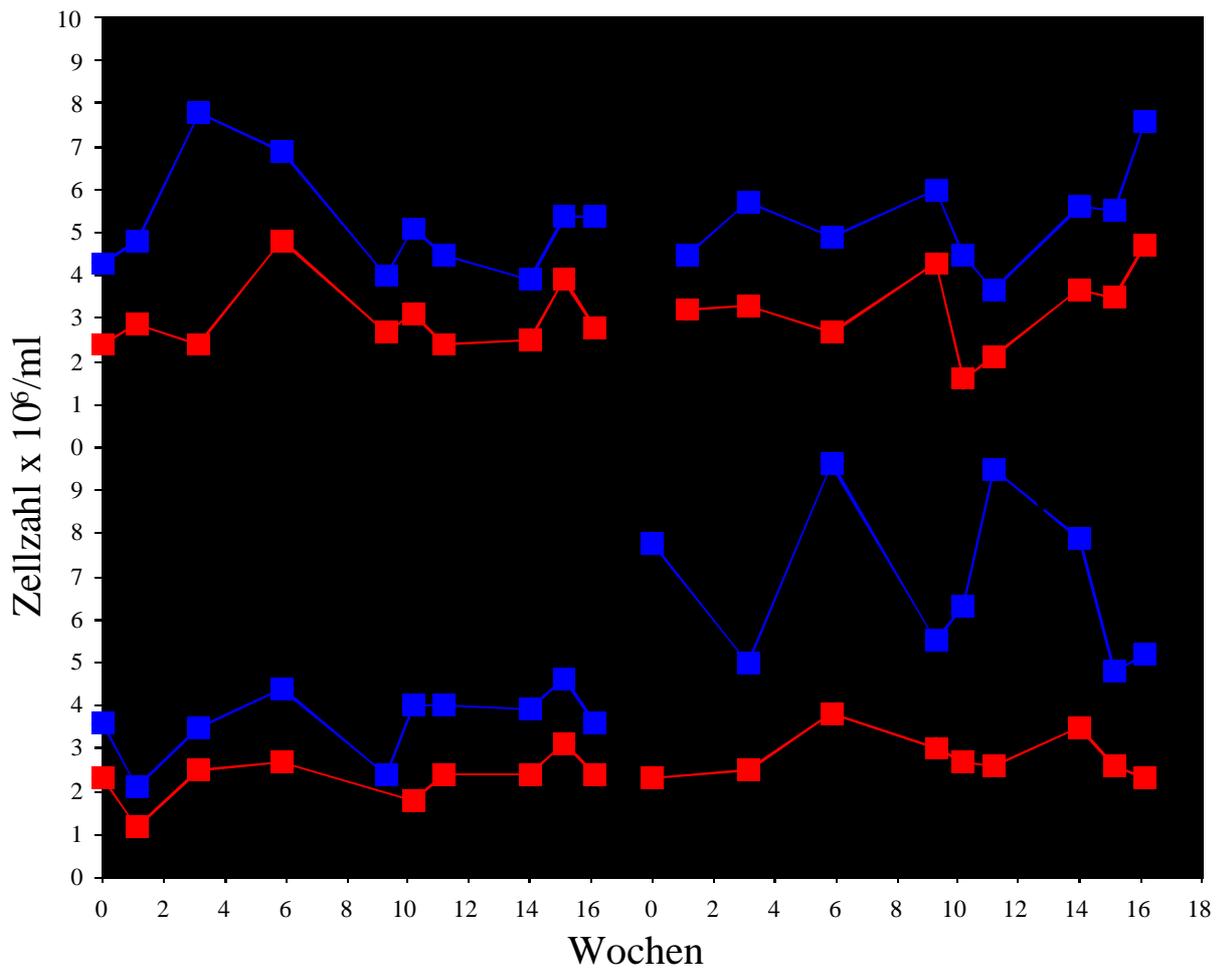


Abb. 1: Entwicklung der Leukozytenzahl (◆) und Lymphozytenzahl (◆) der SIVagm-positiven AGM vor und nach Immunstimulation mittels Tetanustoxoid zwei Jahre nach Basisimmunisierung. Die Zellzahlen wurden mit einem Blutbildmessgerät (Coulter Electronics, Krefeld) ermittelt. Es wurde acht Wochen vor der 1. Immunstimulation (Pfeile) mit der Erhebung der Basiswerte begonnen.

3.1.2. Nachweis der Lymphozytenproliferationskapazität

Um die Stimulation der Zellproliferation durch Tetanustoxoid *in vitro* zu testen, wurde ein ³H-Thymidin-Einbau-Test durchgeführt.

Die PBMC aller Tiere zeigten *in vitro* einen niedrigen Stimulationsindex bei Einsatz von Tetanustoxoid als Stimulans (siehe Abb.2). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Tetanustoxoid, d.h. bei einer Verdünnung von 1:100, konnten maximal Stimulationsindizes (SI) von 10 nachgewiesen werden. Ausgehend davon, daß es sich bei Tetanustoxoid um ein sehr starkes Recall-Antigen handelt, wäre ein Stimulationsindex von 50-100 zu erwarten gewesen. Die Daten lassen darauf schließen, daß nach Basisimmunisierung und wenige antigenspezifische Gedächtniszellen verblieben sind. Demzufolge konnte keine antigenspezifische Stimulation und damit einhergehende Proliferation induziert werden.

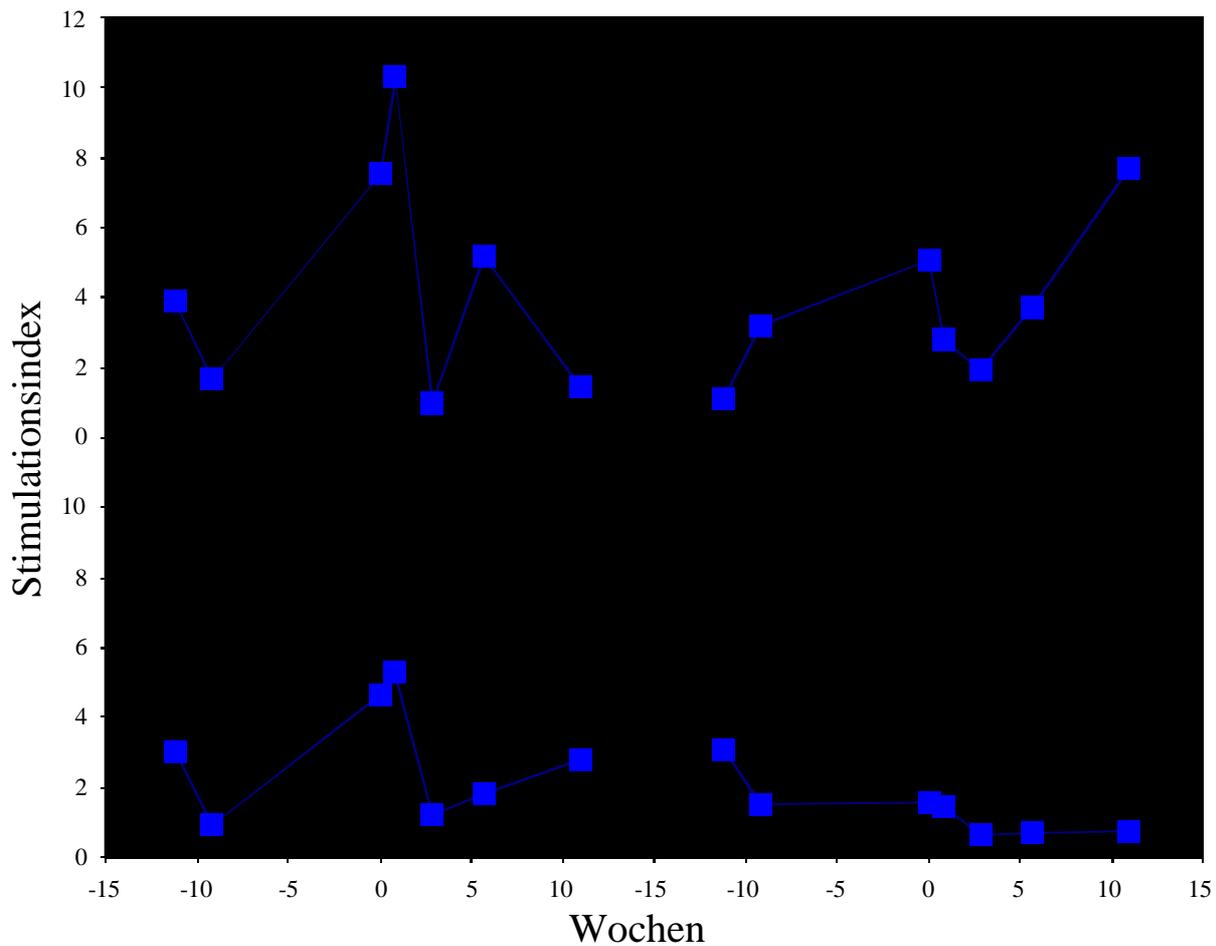


Abb. 2: Einfluß einer Antigen-spezifischen Immunstimulation (Tetanustoxoid) auf die Lymphozytenproliferationskapazität von SIVagm-positiven AGM-PBMC *in vitro*. Der Immunisierungszeitpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.3. FACS-Analyse zur Ermittlung der CD3⁺-CD4⁺-, CD8⁺-, CD25⁺- und HLA-DR⁺-Zellen

Bei allen untersuchten AGM konnte während der gesamten Stimulationsstudie keine signifikante Änderung der CD4⁺CD3⁺-Zellen beobachtet werden (siehe Abb.3). Die Anzahl der T-Helferzellen betrug im Durchschnitt etwa 10% der Gesamtleukozytenzahl. Dieses Verhältnis änderte sich bei keinem der Tiere und blieb von der Tetanustoxoidgabe unbeeinflusst.

Auch die CD8⁺CD3⁺-Zellen zeigten keine Änderung im Verlauf der Studie. Durchschnittlich betrug der Anteil 60-80% der Gesamtleukozytenzahl.

Der Aktivierungsmarker HLA-DR blieb bei allen AGM während der gesamten Studie praktisch unbeeinflusst. Weder eine prozentuale Zu- noch Abnahme an HLA-DR⁺CD4⁺-Zellen konnte beobachtet werden. Der Aktivierungsstatus der T-4-Helferzellen blieb unbeeinflusst von der Tetanusimmunisierung.

Das gleiche gilt für $CD25^+CD3^+$ -Zellen. $CD25$ ist ein für T-Zellen spezifischer Aktivierungsmarker, der nur dann exprimiert wird, wenn die Zellen durch ein Antigen stimuliert wurden. Im Verlauf der Studie kam es nicht zu einer Vermehrung der $CD25^+CD3^+$ -Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle FACS-Daten dafür sprechen, daß bei keinem Tier zum Zeitpunkt der Immunisierungen in messbarem Umfang Gedächtniszellen existierten, welche durch Tetanustoxoid eine antigenspezifische Stimulation hätten zeigen können. Weder der Aktivierungszustand noch die Anzahl der T-Zellen zeigte eine durch die Tetanusgabe induzierte Änderung.

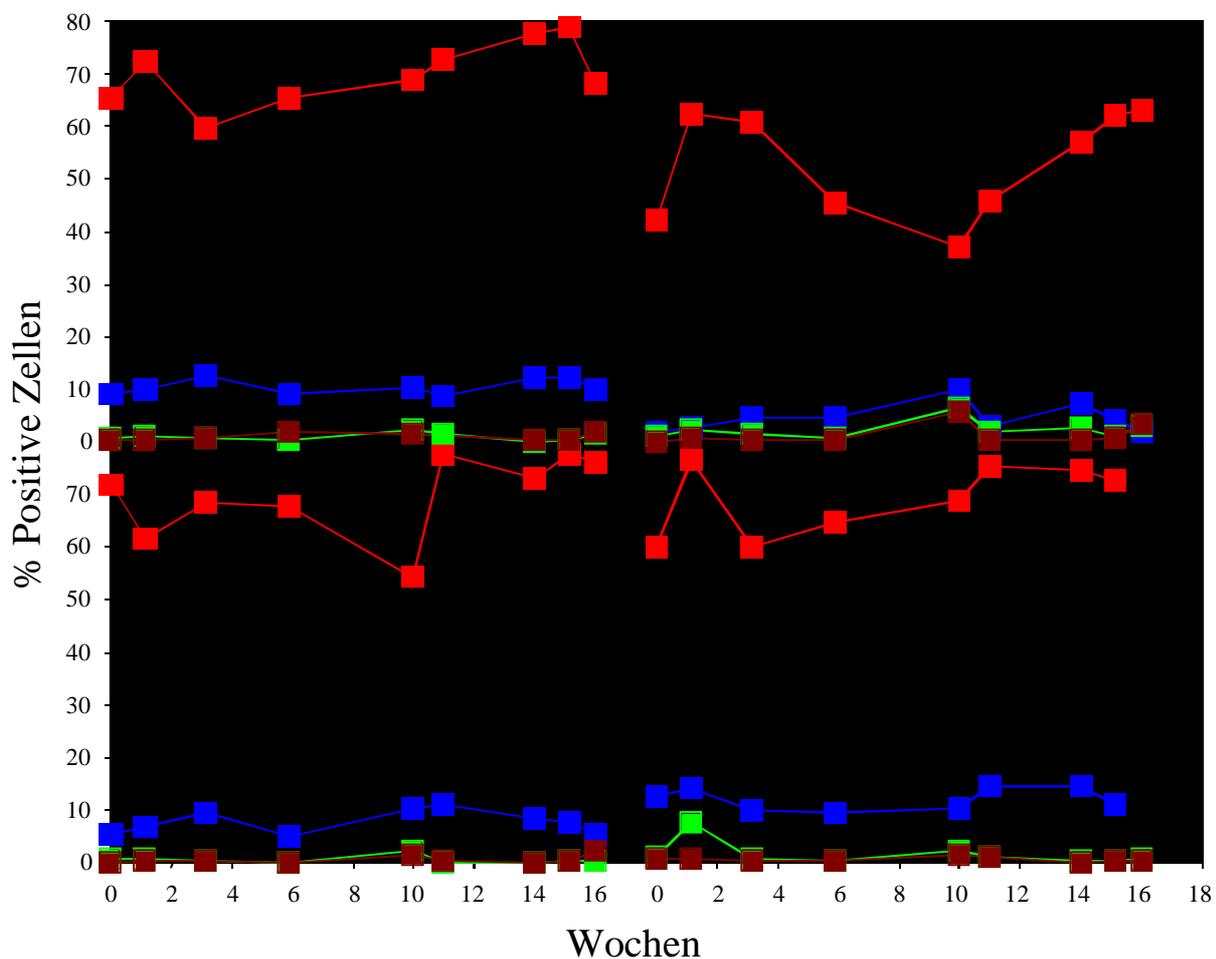


Abb. 3: Einfluß einer Antigen-spezifischen Stimulation (Tetanustoxoid) von SIVagm-positiven AGM auf den Anteil der $CD8^+ CD3^+$ -T-Zellen (◆), $CD4^+ CD3^+$ -T-Zellen (◆), $CD25^+ CD3^+$ -T-Zellen (■) und HLA-DR- $CD3^+$ -T-Zellen (■). Gemessen in % Positive Zellen an Gesamt-PBMC. Bestimmung mittels FACS.

3.1.4. Bestimmung der zellassozierten Virusbelastung

Um den Einfluß einer Immunstimulation auf die zellassozierte Virusbelastung SIVagm-infizierter AGM zu überprüfen wurde eine Virustitration durchgeführt. Bestimmt werden dabei die SIVagm infizierten Zellen, die in der Lage sind, bei Kokultivierung mit suszeptiblen Zellen,

Virus zu produzieren. Nachgewiesen wird die Infektion der C8166-Zellen nach vier Wochen mittels Immunperoxidase-Test.

AGM 94 zeigte sehr geringe Schwankungen im Bereich von nicht mehr nachweisbaren Mengen bis ca. 4 infizierte Zellen pro 10^6 PBMC. AGM F15, 38 und 95 zeigten noch vor dem ersten Boost einen Anstieg auf etwa 60-100 infizierte Zellen pro 10^6 PBMC. Verglichen mit anderen Studien, sowohl der SIV-Infektion bei AGM als auch der SIVmac-Infektion von Rhesusaffen, sind solche Schwankungen im Verlauf der chronischen Phase der Infektion durchaus als normal zu bezeichnen. Die Ergebnisse liefern keinen Hinweis darauf, daß die Antigenstimulation zu einer Änderung der zellassozierten Virusbelastung geführt hat. Die zellassozierte Virusbelastung unterliegt prinzipiell großen Schwankungen. Es ist deshalb schwer, einen direkten ursächlichen Zusammenhang herzustellen.

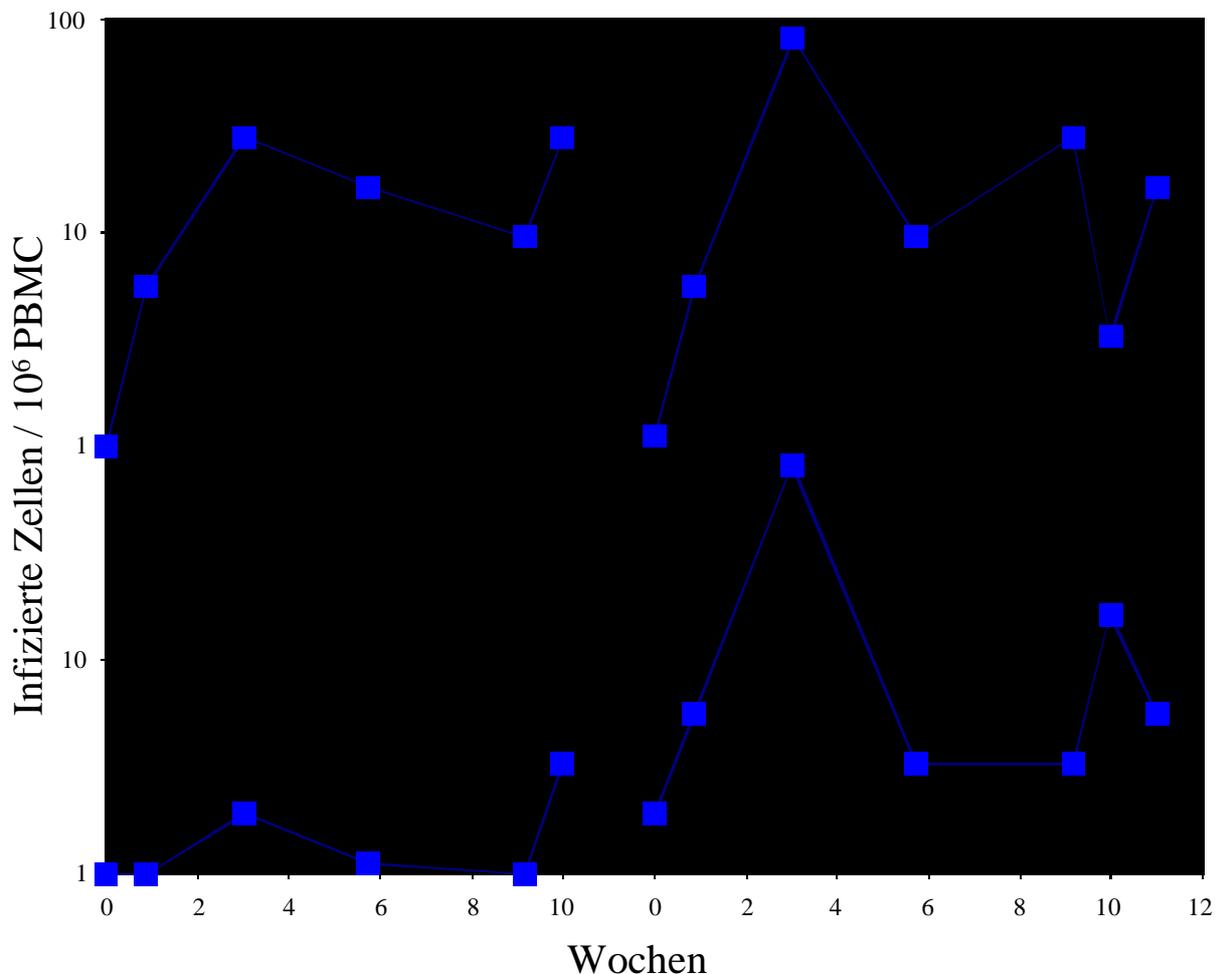


Abb.4: Entwicklung der zellassozierten Virusbelastung SIVagm-positiver AGM unter Einfluß einer Immunstimulation mittels Tetanustoxoid. Virusreisolierung durch Kokultivierung mit C8166-Zellen und Nachweis der SIVagm-Expression im IPA. Angabe der Anzahl infizierter PBMC pro 10^6 PBMC. Die Basiswerte wurden über einen Zeitraum von acht Wochen vor der ersten Immunisierung bestimmt. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Immunisierung.

3.1.5. Messung der retroviralen RT-Aktivität mittels 5'-Nuklease-PERT-Assay zum Nachweis der Plasmavirusbelastung

Der 5'-Nuklease-PERT-Assay dient dem sensitiven Nachweis retroviraler Reverse Transkriptase. Er wurde für die Tetanusstimulationsstudie, anstelle der erst zu einem späteren Zeitpunkt etablierten TaqMan-RT-PCR, zur Quantifizierung der Plasmavirämie eingesetzt. Hierbei handelt es sich zwar um ein sehr sensitives Nachweisverfahren mit einer Nachweisgrenze von bis zu zehn Template-Molekülen, allerdings besteht eine sehr hohe Störanfälligkeit, da das Virus in der zu untersuchenden Plasmaprobe vorab pelletiert wird und der Überstand abgesaugt wird. Dabei variiert das Volumen des abgesaugten Überstandes und dementsprechend die Virusmenge im anschließend mit 50 µl Aqua dest resuspendiertem Pellet. Die Reproduzierbarkeit einzelner Proben ist somit nicht optimal und die Schwankungen lassen keinen sicheren Vergleich zu. Desweiteren handelt es sich, wie bereits erwähnt, um den Nachweis retroviraler Reverse Transkriptase und nicht um den spezifischen Nachweis von SIVagm-RNA. Das Testverfahren sollte deshalb nachfolgend durch eine RNA-spezifische quantitative RT-PCR ersetzt werden.

Für jedes der vier Untersuchungstiere bestehen vier Messpunkte vor dem ersten Boost und weitere drei im Abstand von einer Woche nach jeder Immunisierung (siehe Abb.5).

Betrachtet man den Verlauf von AGM F15, so wird deutlich, daß weder der erste noch der zweite Boost eine erhöhte oder verminderte Virusreplikation induzierte. Die Schwankungen im Verlauf der Studie sind gering und es wurden Werte von 1×10^5 - 8×10^6 Viren/ml detektiert.

Auch AGM 38 zeigte schon vor Beginn der Antigenstimulation Schwankungen im Bereich von 2×10^2 - 6×10^3 Viren/ml. Etwa zwei Wochen nach dem ersten Boost fiel die Virusbelastung um etwa 1,5 Logstufen, stieg aber nach dem zweiten Boost auf den alten Wert von etwa 3×10^4 Viren/ml an. Von einem Einfluß der Immunstimulation auf die Virusbelastung kann auch bei diesem Tier nicht ausgegangen werden.

AGM 94 zeigte mit etwa 1×10^2 Viren/ml die niedrigste gemessene Virusbelastung aller untersuchten Tiere. Diese stieg nach dem ersten Boost um etwa 2 Logstufen an, zeigte aber nach dem zweiten Boost keine Änderung. Aufgrund der schon vor Stimulation stattfindenden Schwankungen kann auch hier kein Zusammenhang zwischen Stimulation und Virusbelastung hergestellt werden.

AGM 95 zeigte von allen Tieren im Verlauf der Studie die geringsten Schwankungen, d.h. die Werte lagen während des gesamten Zeitraums zwischen 1×10^4 - 1×10^5 Viren/ml.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß die wiederholte Immunisierung der Tiere mit Tetanustoxoid zwei Jahre nach Basisimmunisierung keinen Einfluß auf die Plasmavirämie hatte.

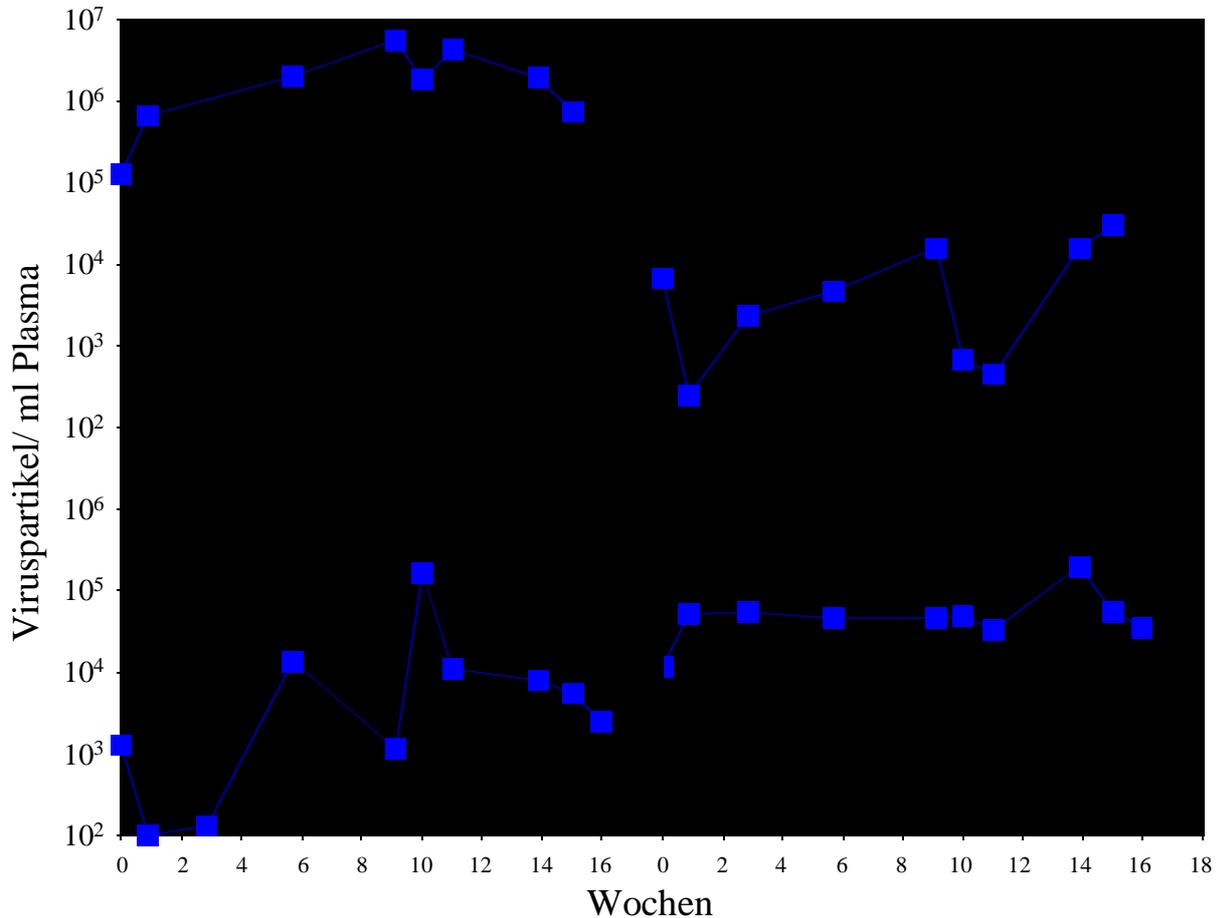


Abb. 5: Überprüfung der peripheren Virusbelastung (Viruspartikel/ml Plasma) durch den 5'-Nuklease-PERT-Assay in SIVagm-positiven AGM nach zweifacher Stimulation des Immunsystems mit Tetanustoxoid. Die Zeitpunkte sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

3.1.6. Ausgang der Immunstimulationsstudie

Der Zeitpunkt der SIVagm-Infektion lag vor der Tetanus-Basisimmunisierung. Deshalb ist davon auszugehen, daß die Antigen-vermittelte Aktivierung durch Tetanustoxoid, d.h. die exogene Stimulation, zu einer Proliferation von $CD4^+$ -T-Zellen und damit zu einer Vermehrung von Targetzellen für SIVagm geführt hat. Ausgehend davon, daß anschließend eine vermehrte Infektion der $CD4^+$ -T-Zellen und nachfolgend eine Zerstörung dieser stattgefunden hat, kam es zur Elimination der Tetanus-spezifischen Gedächtniszellen und somit war die zweifache Immunisierung mit Tetanustoxoid ineffektiv. Dies würde sowohl die zellbiologischen als auch die

virologischen Ergebnisse erklären. Letztendlich kann mit dieser Studie nicht abschließend geklärt werden, ob eine Immunstimulation einen Einfluß auf die Virusbelastung von SIVagm-infizierten AGM hat. Sinnvoll wäre es, die Studie mit verändertem Versuchsaufbau durchzuführen. Dabei würden die Tiere vor der SIVagm-Infektion eine Basisimmunisierung mit Tetanustoxoid erhalten und erst dann würde eine Immunstimulation durchgeführt.

3.2. Gag-Studie

Die Gründe für die Resistenz von SIVagm-infizierten AGM gegen AIDS-ähnliche Symptome sind bislang trotz intensiver Forschung unklar. Bekannt ist, daß die Infektion in vielen Punkten mit der HIV-Infektion des Menschen übereinstimmt. Ein wesentlicher Unterschied jedoch besteht in der Virusbelastung des lymphatischen Gewebes, welche bei SIVagm-infizierten AGM signifikant niedriger ist als bei HIV-infizierten Menschen. Weiterhin kommt es im Gegensatz zur HIV-Infektion, nicht zu einem sog. „Virus-Trapping“, d.h. zur Anheftung von Viruspartikeln auf der Oberfläche von FDC. Ein Phänomen, daß auch bei anderen apathogenen SIV/Primatesystemen gezeigt wurde. Ob es einen Zusammenhang zwischen der niedrigen Viruslast in lymphatischem Gewebe bzw. dem Ausbleiben von Virus-Trapping und dem Fehlen von Gag-Antikörpern gibt ist bislang unklar.

Im Rahmen dieser Studie wurden deshalb AGM mehrfach mit hohen Dosen affinitätschromatographisch gereinigtem Gag-Protein immunisiert und anschließend mit SIVagm infiziert. Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden immunologische und virologische Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es zunächst, eine humorale Immunantwort gegen Gag-Protein zu induzieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich Änderungen im Infektionsverlauf zeigen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie war es, den Einfluß der gebildeten Antikörper auf Ebene der Lymphknoten zu untersuchen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob es zu einem Virus-Trapping kommt und letztlich, ob die Gag-Antikörper einen Einfluß auf die Lymphknoten-anatomie- bzw. physiologie haben. Weiterhin sollte eine quantitative RT-PCR etabliert werden, die eine genaue Messung der Plasmaviruslast zuläßt.

3.2.1. Immunisierungs- und Belastungsschema

Die Tiere der Gruppe A (AGM 197, 201, 212, 97) wurden innerhalb von vier Monaten fünfmal mit 20 µg nativem Gag-Protein in 1 ml Adjuvans (Montanide) immunisiert. Den Tieren der Gruppe B (AGM 230, 154, 162, 163) wurde jeweils 1 ml Montanide verabreicht. Drei Wochen

nach der letzten Immunisierung wurden Gruppe A und B mit 1 ml SIVagm-Zellkulturüberstand infiziert. Alle Tiere wurden daraufhin für einen Zeitraum von sechs Wochen wöchentlich geblutet, nachfolgend nur noch monatlich. Ein Jahr lang wurde allen Tieren Blut entnommen. Die erste Lymphknotenentnahme fand vier Wochen, die zweite Entnahme 19 Monate nach Belastung statt. Die Tiere der Gruppe C (AGM 119, 189, 198, 168) blieben während des gesamten Zeitraums unbehandelt.

3.2.2. Herstellung und Testung des zur Immunisierung verwendeten Gag-Proteins

Zur Aufreinigung des Gag-Proteins aus Viruslysat wurde eine CNBr-aktivierte Sepharose, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen Gag beladen war, eingesetzt. Die Reinheit des Proteins wurde im Westernblot gezeigt.

Als Positivkontrolle wurde Viruslysat eingesetzt. Nach immunchemischer Detektion zeigte sich in der Gag-Protein-Probe nur eine einzige Bande (24 kD). Die Positivkontrolle zeigte ein für SIVagm spezifisches Bandenmuster. Zusätzlich wurden diese Ergebnisse mit einer Nikaido-Färbung bestätigt.

Um die Konzentration zu bestimmen, wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (BCA-Protein Test, Pierce) verwendet. Gemessen wurden 142,4 µg/ml Protein. Für die weitere Verwendung wurde die Lösung auf eine Konzentration von 20 µg/ml verdünnt.

3.2.3. Messung der Antikörper gegen Gag- bzw. Env-Protein zur Überprüfung der humoralen Immunantwort

Das erste Ziel dieser Studie war es, durch Immunisierung der Tiere mit hohen Dosen gereinigten Gag-Proteins, eine humorale Immunantwort zu induzieren. Bislang war unklar, ob dies auf experimentellem Wege möglich ist oder ob der natürliche Wirt gegen Gag-Protein tolerant ist.

Die Gruppe A, die sechsmal mit nativem Gag-Protein immunisiert wurde, entwickelte schon etwa vier bis sechs Wochen nach der ersten Gabe Gag-Antikörper (Abb.6). Diese erreichten mit etwa 1:10.000 Titern nach der dritten Immunisierung ihr Maximum, sanken dann bei Ausbleiben weiterer Antigengaben um etwa eine Logstufe ab. Es überraschte zunächst, wie unproblematisch die Induktion einer Immunantwort gegen Gag-Protein war bzw. wie hoch die entwickelten Titer waren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß keine natürliche Toleranz gegen Gag-Protein vorliegt. Um zu gewährleisten, daß die Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Lymphknotenentnahme ausreichend hoch sind, um potentiell Virus-Trapping zu ermöglichen, wurden die Tiere zwei

Wochen vorher erneut immunisiert. Die Antikörpertiter stiegen bei drei der vier Tiere auf 1:10.000-1:100.000 an. Wie zu erwarten, konnte bei Kontrollgruppe B bzw. C keine Immunantwort gegen Gag-Protein detektiert werden. Dies bestätigte nochmals, daß es weder im Verlauf einer natürlichen noch einer experimentellen Infektion von SIVagm zu einer Immunantwort gegen das Kernprotein kommt.

Um die humorale Immunantwort gegen SIVagm im Verlauf der Studie zu bestimmen, wurde zunächst Gesamtviruslysate als Antigen im ELISA eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß der unspezifische Hintergrund zu hoch war. Da außerdem eine von Gag-spezifischen Antikörpern unabhängige Immunantwort gemessen werden sollte, wurde stattdessen Env-Protein als Antigen verwendet

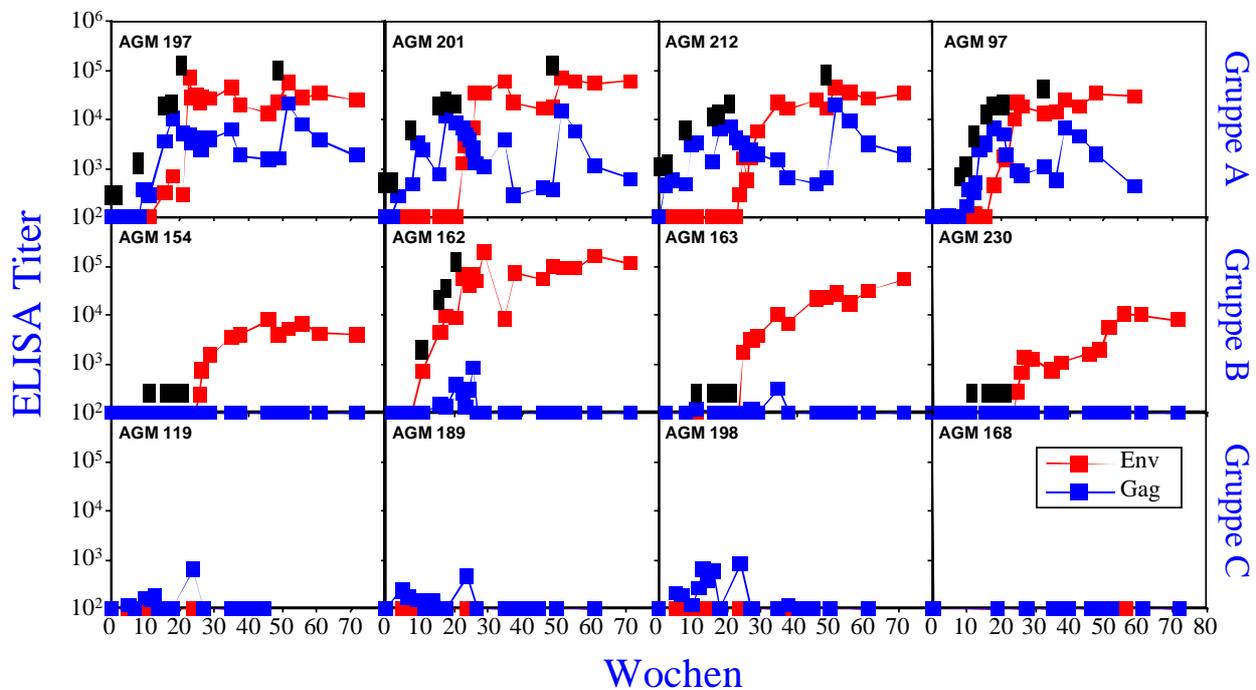


Abb6.: Entwicklung der Gag-Antikörper (◆) nach vierfacher Immunisierung mit nativem Gag-Protein (Gruppe A) (▼) und nach SIVagm-Infektion (▼) bzw. Entwicklung der Env-Antikörper (◆) nach SIVagm-Infektion. Die grünen Pfeile zeigen die Behandlungszeitpunkte mit Montanide.

Weder Gruppe A noch Gruppe B zeigte bezüglich der Antikörperbildung Auffälligkeiten. Etwa vier Wochen nach Challenge konnten bei allen Tieren die höchsten Werte gemessen werden. Mit etwa 1:10.000 lagen die Titer der Gruppe A ungefähr eine Logstufe höher als die Werte der Gruppe B. Der Verlauf entsprach bei beiden Gruppen bereits beschriebenen Daten. AGM162 zeigte schon vor experimenteller Infektion eine Immunantwort gegen Env-Protein. Dieses Tier

hatte sich zu einem Zeitpunkt auf natürlichem Weg infiziert, der zwischen der Rekrutierung der Versuchstiere und der Belastung lag.

3.2.4. Bestimmung der zellassozierten Virusbelastung mittels Virustitration

Um das Ausmaß der zellassozierten Virusbelastung während der Gag-Immunisierungsstudie zu ermitteln, wurden die AGM-PBMC in acht Verdünnungsstufen austitriert und mit C8166-Zellen kokultiviert. Daraus wurde die Anzahl der infizierten Zellen pro 10^6 PBMC ermittelt.

Alle Tiere der Gruppe A (AGM197, 201, 212, 97), d.h. die Gag-Protein-immunisierten Tiere, zeigten etwa zwei Wochen nach Infektion bezüglich der zellassozierten Virusbelastung einen Peak. Die Werte lagen bei AGM 197 und 201 bei etwa 6×10^3 infizierten Zellen pro 10^6 PBMC. Das Tier AGM 212 lag mit etwa 3×10^2 darunter und AGM 97 zeigte mit 10^1 infizierten Zellen pro 10^6 PBMC den niedrigsten Peak. Die Werte fielen dann bei AGM 197, 212 und 97 auf Werte zwischen 10^0 und 10^1 infizierte Zellen pro 10^6 PBMC ab und stiegen in der 40. Woche, also nach erfolgtem 6. Gag-Protein-Boost wieder transient an.

Bei Gruppe B, d.h. der unbehandelten Gruppe, verhielt sich der Verlauf der zellassozierten Virusbelastung ähnlich. Die Tiere zeigten etwa zwei Wochen nach Challenge ein Maximum zwischen 10^1 – 10^4 infizierten Zellen pro 10^6 PBMC, die zellassozierte Virusbelastung sank dann wieder ab und zeigte Schwankungen im Bereich von 10^0 – 5×10^1 infizierten Zellen pro 10^6 PBMC.

Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, so zeigen alle Tiere einen typischen Infektionsverlauf mit Werten, wie sie bereits beschrieben wurden und wie man sie bei einer SIV-Infektion erwarten würde. Ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Virusbelastung zwischen beiden Gruppen wird nicht deutlich.

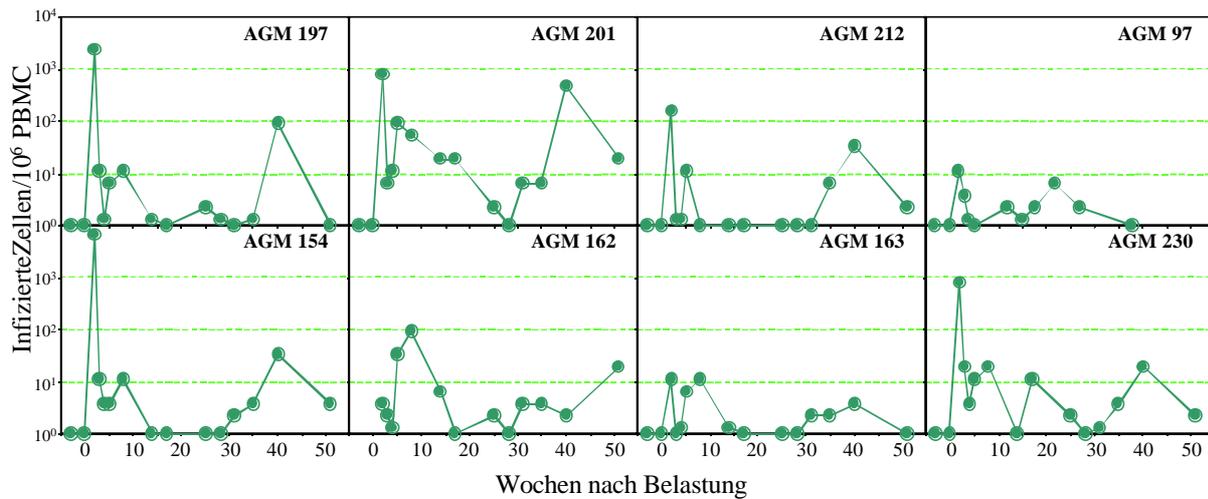


Abb. 7: Verlauf der zellassoziierten Virusbelastung in AGM-PBMC dargestellt als infizierte PBMC pro 10^6 PBMC. Der Anteil der infizierten Zellen wurde durch Endpunktverdünnung der PBMC mit suszeptiblen T-Zellen ermittelt.

3.2.5. Bestimmung der Provirusbelastung

Um die Menge an Provirus-tragenden PBMC zu ermitteln, wurde die Anzahl der Provirus Kopien pro 10^6 PBMC unter Zuhilfenahme der quantitativen TaqMan-PCR bestimmt.

Alle Tiere der Gruppe A zeigten etwa zwei Wochen nach Infektion einen Maximalwert von 566–14722 proviralen Kopien pro 10^6 PBMC. Die Virusbelastung wurde innerhalb von sechs bis acht Wochen nach unten reguliert und blieb bis auf kleine Schwankungen auf einem Plateau bestehen. Die sogenannten „Set-points“, d.h. die durchschnittlichen Provirusbelastungen, lagen zwischen 73-810 proviralen Kopien pro 10^6 PBMC. AGM 201 zeigte dabei die höchste Virusbelastung.

Bei Gruppe B war die Anzahl an Provirus-tragenden PBMC im Verlauf der Infektion sehr ähnlich. Auch hier erreichten die Werte ihr Maximum etwa zwei Wochen nach Challenge mit 681-14722 proviralen Kopien pro 10^6 PBMC. Die Belastung wurde dann auch hier auf ein Plateau runter reguliert und es wurden Set-points zwischen 159-810 pro 10^6 PBMC gemessen. AGM 162 zeigte schon vor der experimentellen Belastung mit SIV_{agm} eine Proviruslast von 5×10^2 Kopien pro 10^6 PBMC, da die natürliche Infektion vor der experimentellen Belastung stattfand.

Beim Vergleich der beiden Gruppen wird kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proviruslast deutlich.

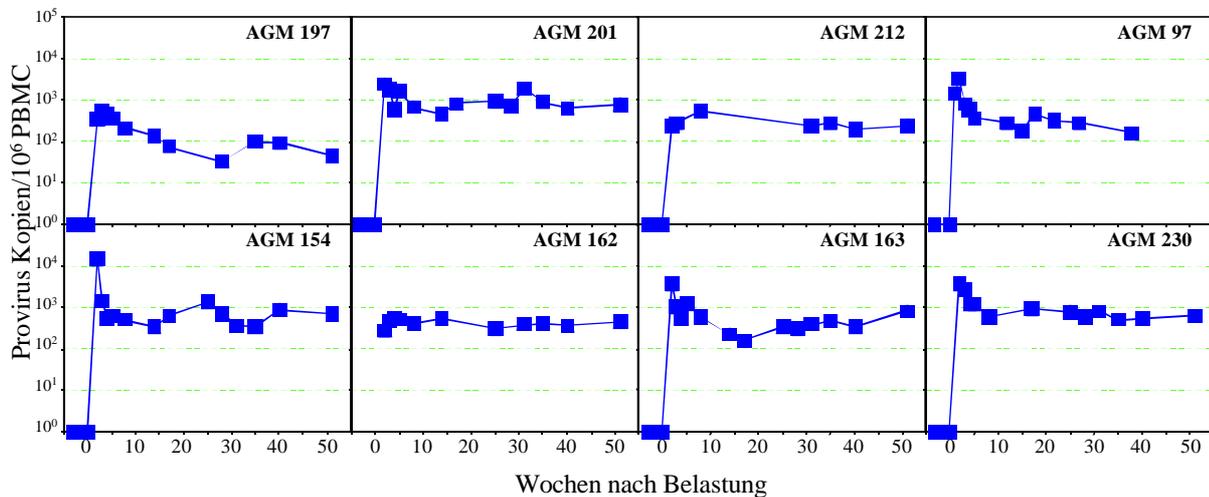


Abb.8: Überprüfung der proviralen Viruslast (Provirus-Kopien pro 10⁶ PBMC) von AGM nach experimenteller Belastung mit SIVagm mittels quantitativer Taqman-PCR.

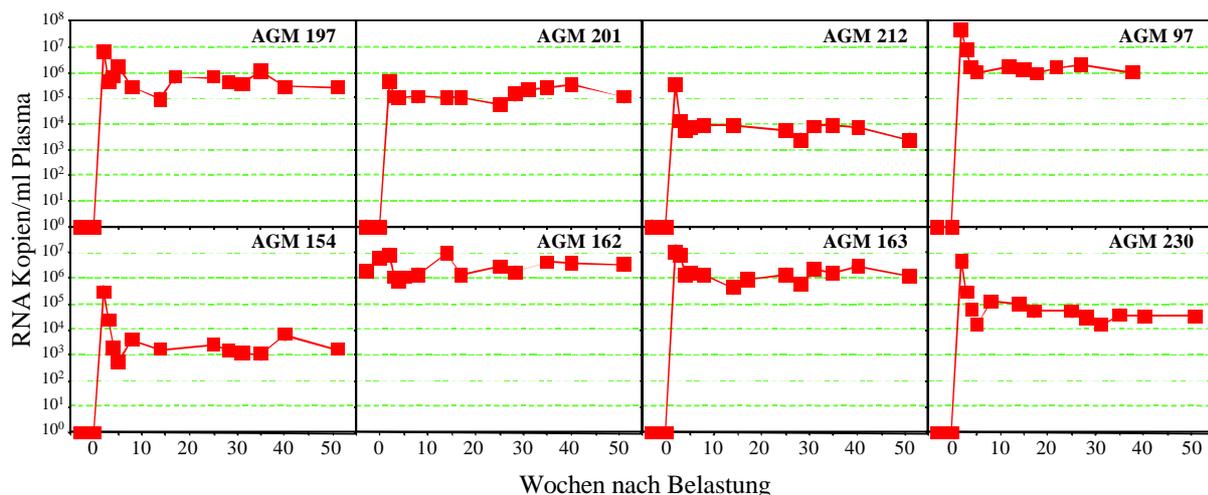
3.2.6. Etablierung einer SIVagm-spezifischen TaqMan-RT-PCR

Die Krankheitsprogression im Verlauf der HIV-Infektion korreliert mit der Höhe der Plasmavirusbelastung. Deshalb wurde lange vermutet, daß der apathogene Verlauf der SIVagm-Infektion im natürlichen Wirt durch eine niedrige Virusbelastung bedingt ist. Eines der wichtigsten Ziele dieses Projekts war es, ein Nachweisverfahren zu etablieren, daß die genaue Bestimmung der SIV-RNA-Kopienzahl im Plasma SIVagm-infizierter AGM zuläßt. Die größte Schwierigkeit ergab sich hierbei aus der Tatsache, daß es sich bei dieser Primatenspezies um eine sehr heterologe handelt. Man unterscheidet vier verschiedene Subspezies, Grivet, Vervet, Sabeus und Tantalus. Geographisch hat die Differenzierung schon vor sehr langer Zeit stattgefunden, zu einem Zeitpunkt, als die Tiere schon mit dem Virus infiziert waren. Sequenzvergleiche zeigten, daß sich Wirt und Virus gemeinsam entwickelt haben und somit auch das Virus selbst eine große Heterogenität aufzeigt. Die im folgenden angewendete Real-time-PCR ist bezüglich der Primer und der Sonde spezifisch für AGM_{vervet}. Obwohl hiermit die Quantifizierung viraler RNA von Zellkulturüberstand schnell möglich war, zeigte keine der untersuchten Heparinplasmaproben ein positives Signal. Es stellte sich heraus, daß Heparin als Inhibitor der RT-PCR fungierte. Erst nach aufwendiger Testung vieler Nukleinsäure-Isolierungs-Methoden konnte ein RNA-Isolierungskit der Firma Roche gefunden werden, der auch den Einsatz von Heparinplasma zuläßt. Durch einen

zusätzlichen sog. ‚Inhibitor-removal-buffer‘ ist es möglich, das Heparin während des Aufreinigungsverfahrens zu entfernen. Um bei dem Test die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit optimal zu gestalten, wurde eine sogenannte One-step-RT-PCR konzipiert. Da hierbei der Reaktionsansatz alle benötigten Komponenten schon beim Start der RT-Reaktion enthält, entfallen weitere Pipettierschritte und damit weitere Fehlerquellen. Außerdem wurde die RT-Reaktion mit zwei verschiedenen Reverse Transkriptasen durchgeführt. Eine der beiden Enzyme arbeitet besonders effektiv bei der Umschreibung niedriger Mengen RNA, die andere besonders effizient bei der Umschreibung großer Mengen RNA. Somit ist die Vergleichbarkeit sehr unterschiedlich konzentrierter Proben in einem Testansatz gewährleistet.

3.2.7. Bestimmung der Plasmavirusbelastung

Die Plasmavirusbelastung der Gruppe A erreichte etwa zwei Wochen nach Infektion einen Peak. Es wurden Werte von $3,2 \times 10^5$ - $4,2 \times 10^7$ RNA-Kopien pro ml gemessen (siehe Abb.10). Zwischen der 2. und 6. Woche fiel die Plasmavirusbelastung um etwa 1-2 Logstufen ab und stabilisierte sich auf einen sogenannten ‚set-point‘, dargestellt in Abb. 10, der im Bereich zwischen $2,1 \times 10^3$ - $7,2 \times 10^6$ Kopien pro ml lag (siehe Abb.11). Die Gruppe B zeigte ähnliche Ergebnisse. Die höchste Viruslast, d.h. $2,9$ - $6,5 \times 10^6$ Kopien pro ml wurden zwei Wochen nach Challenge gemessen. Auch hier fand zwischen der 2. und 6. Woche eine Regulierung auf einen ‚set-point‘ statt. Hier lagen die Werte zwischen $1,5 \times 10^4$ und $5,8 \times 10^5$ Kopien pro ml. Es wurde



kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und Gruppe B deutlich.

Abb. 9: Überprüfung der peripheren Virusbelastung im Plasma (virale RNA-Kopien/ml Plasma) durch quantitative Taqman-RT-PCR in AGM nach experimenteller Infektion mit SIVagm.

Daß die Plasmavirusbelastung so hoch bzw. vergleichbar war mit der Virusbelastung pathogener SIV-bzw. HIV-Infektionen, war überraschend. Bislang gab es keine genauen Daten bezüglich der Plasmavirusbelastung in AGM. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß eine schwache oder kontrollierte Virusreplikation für den benignen Verlauf der Infektion verantwortlich ist. Die Existenz von Gag-Antikörpern hatte keinen Einfluß auf die Höhe der Plasmavirusbelastung.

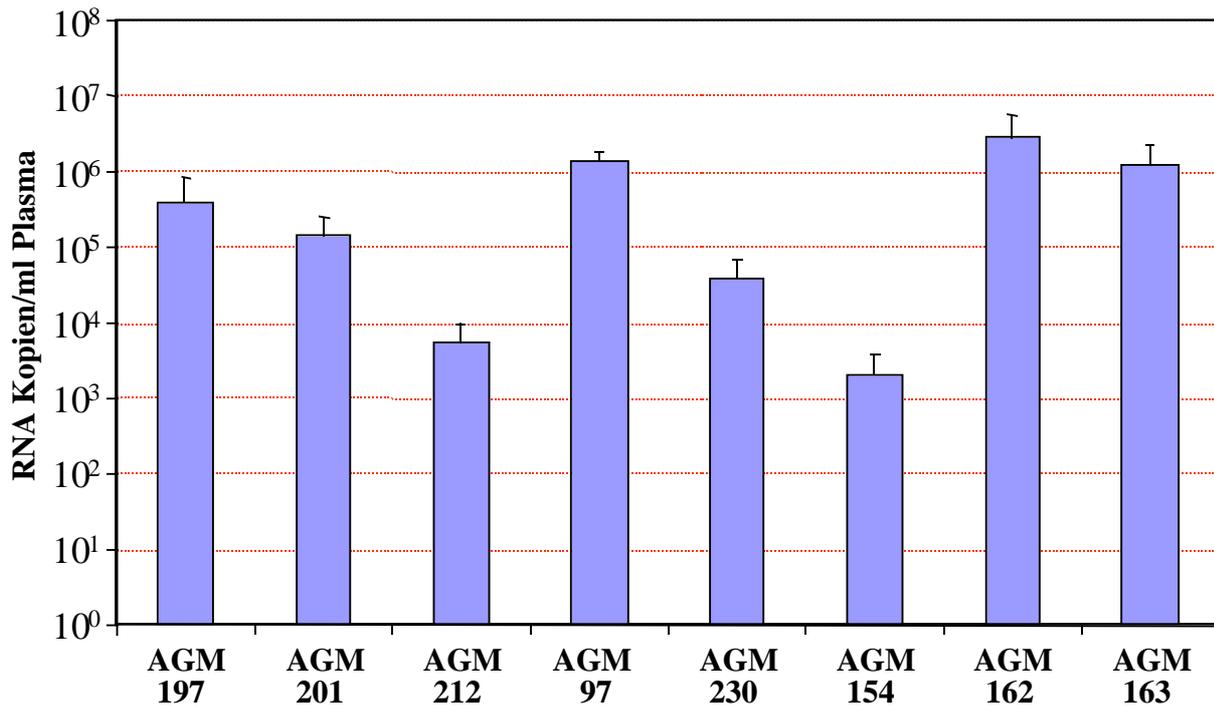


Abb. 10: Darstellung der durchschnittlichen Plasmavirusbelastung in der chronischen Phase der experimentellen SIVagm-Infektion.

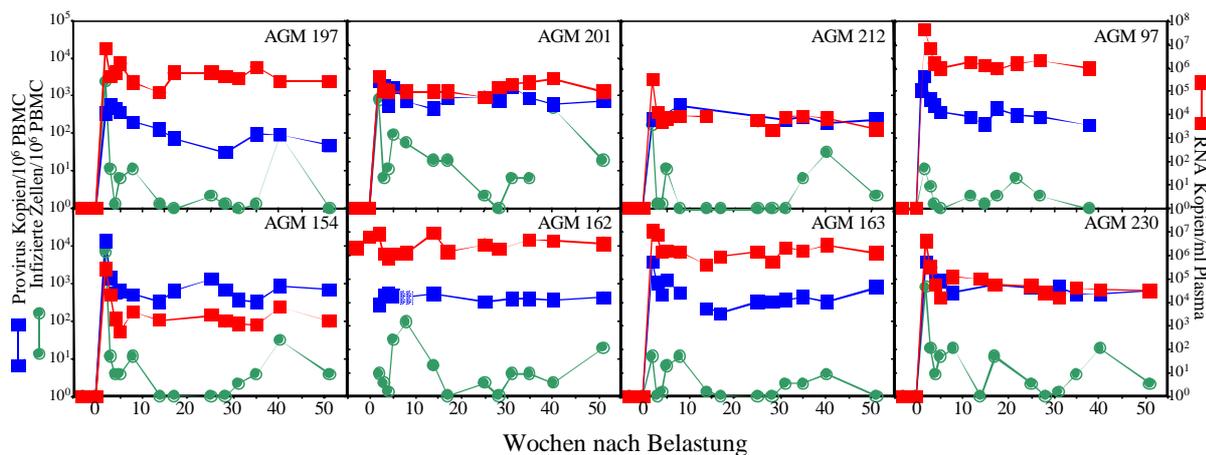


Abb. 11: Vergleich der zellassoziierten Virusbelastung (●), der Provirusbelastung (▲) und der Plasmavirusbelastung (◆) SIVagm-infizierter AGM.

3.2.8. Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde zum Nachweis von SIVagm-RNA in Lymphknoten mittels ISH

Nachdem unter Verwendung von mutagenisierenden Primern ein SIVagm-spezifisches Insert mit passenden Schnittstellen für den Vektor pSPT18 bzw. pSPT19 generiert wurde, konnte dieses nach Klonierung in vitro transkribiert werden. Zuvor wurde noch durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI bzw. HindIII gezeigt, daß die Klonierung erfolgreich war. Die Größe des Fragments hatte nach einem Restriktionsverdau mit HindIII bzw. EcoRI die gewünschte Größe von 3250 bp. Eine Sequenzieranalyse (MWG-Biotech AG, Ebersberg) stellte sicher, daß es sich bei dem Insert um die richtige Sequenz handelte.

Nach erfolgter in vitro Transkription, laut Anleitung des Herstellers, wurde die Menge der RNA photometrisch bestimmt und es konnte eine Ausbeute von 700 µg/ml gemessen werden. Um sicherzustellen, daß dabei auch die DIG-Markierung effizient abgelaufen ist, wurde ein Dot-blot-Test durchgeführt. Parallel zu einer Verdünnungsreihe der RNA-Sonde wurde dabei DIG-markierte Kontroll-RNA bekannter Konzentration auf eine Nylon-Membran aufgetragen und diese durch ein immunologisches Nachweisverfahren detektiert. Dabei konnte die Menge an DIG-markierter RNA-Sonde zeitgleich semiquantifiziert werden. Es wurden etwa 150 ng/µl RNA-Sonde synthetisiert.

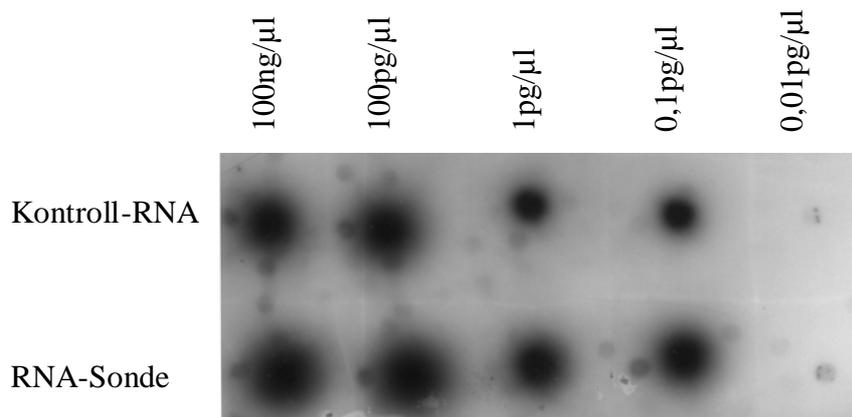


Abb. 12: Dot-Blot Analyse einer SIVagm-spezifischen DIG-markierten RNA-Sonde. Zur semiquantitativen Bestimmung wurde parallel Kontroll-RNA bekannter Konzentration aufgetragen.

3.2.9. Histologische Untersuchungen

3.2.9.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die entnommenen Lymphknoten der untersuchten Tiere auf morphologische Veränderungen hin zu beurteilen, wurde mit der HE-Färbung eine Standardfärbung gewählt.

Die Lymphknoten werden morphologisch grob in Rinde und Mark eingeteilt. Sie bestehen aus einem offenen Maschenwerk feiner retikulärer Fasern, welches einen lockeren Halt für die ständig wechselnden Lymphozytenpopulationen bietet. In der Rinde liegen die Lymphozyten dicht aneinander. Innerhalb der Rinde bilden die Lymphozyten eine wechselnde Zahl dicht gepackter Lymphfollikel, in denen man häufig ein weniger dichtes Keimzentrum sieht. Lymphfollikel sind keine konstanten Strukturen, sondern entstehen unter dem Einfluß von Antigenkontakten und bilden sich wieder zurück. Sie sind der wichtigste Aufenthaltsort der B-Lymphozyten. Gedächtniszellen vermehren sich hier bei entsprechender Antigenstimulation und führen somit zu einer Hyperplasie der Sekundärfollikel.

Die Lymphknoten der Gruppe A zeigten vier Wochen nach Challenge eine deutliche Hyperplasie (siehe Abb.13). Die Vergrößerung der Organe war erheblich stärker als bei Gruppe B. In Anbetracht der Tatsache, daß das lymphatische Gewebe schon vor Beginn der Infektion mehrfach mit einem Antigen stimuliert wurde, ist das nicht überraschend. Es zeigte sich bei mikroskopischer Betrachtung, daß Gruppe A etwas größere Sekundärfollikel im Rindbereich gebildet hatte als Gruppe B. Germinale Zentren konnten in allen drei Versuchsgruppen gefunden werden, auch bei zwei Tieren der Negativkontrollgruppe C. Die Lymphknotenstruktur- bzw.

architektur war bei allen Tieren intakt, auch 19 Monate nach Infektion waren die Follikel rund und scharf konturiert. Sie zeigten keine Unregelmäßigkeiten oder Anzeichen einer Lyse.

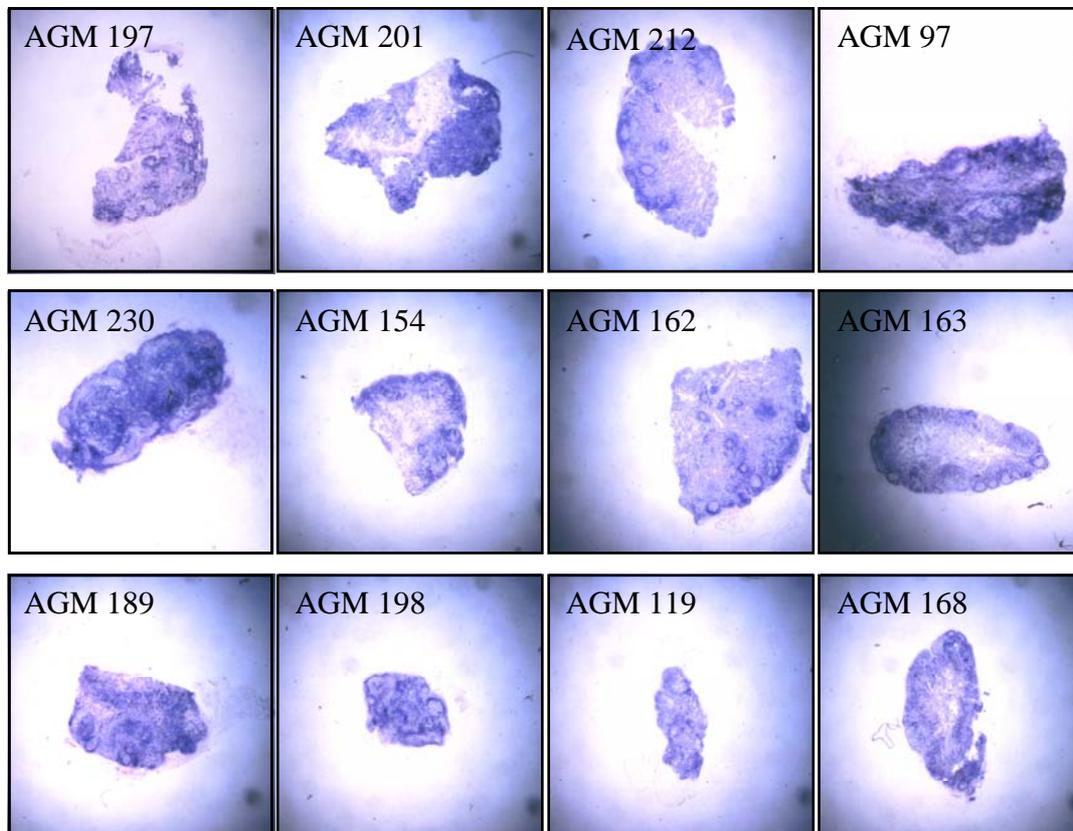


Abb. 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Lymphknoten von AGM vier Wochen nach experimenteller Infektion mit SIVagm.

3.2.9.2. Immunhistochemische Färbung von Lymphknoten zum Nachweis viraler Proteine

Mit dieser Methode sollten SIV-infizierte T-Zellen in Paraffinschnitten von Lymphknoten nachgewiesen werden. Als Primärantikörper wurde dafür ein Antiserum, gewonnen aus Gag-Protein-immunisierten Kaninchen, eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen rabbit-IgG verwendet. Die braunen Niederschläge im Zytoplasma der Zellen zeigten das Reaktionsprodukt einer Standard-Enzymhistochemie-Methode.

Betrachtet man Gruppe A, so sind im Bereich der Rinde deutlich einzeln angefärbte Zellen sichtbar (siehe Abb.14). Besonders im Bereich der Follikel befinden sich gehäuft infizierte Zellen. Aufgrund der Tatsache, daß kein monoklonaler Antikörper sondern ein polyklonales Antiserum eingesetzt wurde, kann die unspezifische hellbraune Hintergrundfärbung als normal betrachtet werden. Prinzipiell wäre ein monoklonaler Antikörper zu bevorzugen. Ein solcher,

gegen das Gag-Protein gerichteter Antikörper (AG3.0), wurde auch zu Beginn der Etablierung eingesetzt. Es konnten aber keine positiven Zellen detektiert werden, da es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Paraformaldehyd-fixiertes Gewebe handelte und deshalb davon auszugehen ist, daß relativ viele Epitope während der Fixation denaturiert wurden. Alternativ dazu wäre der Einsatz von Gefrierschnitten möglich gewesen, wobei hier allerdings die Morphologie des Gewebes während der Färbung erheblich mehr Schaden nimmt.

Auch bei Gruppe B zeigten sich im Bereich der Rinde deutlich angefärbte Zellen, jedoch, insbesondere im Bereich der Keimzentren, deutlich weniger als bei Gruppe A. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die prä-Gag-immunisierte Gruppe eine höhere Viruslast in den Lymphknoten aufzeigt. Die Problematik dieser Methode ergibt sich aus der Tatsache, daß auch bei Gruppe C, also den SIVagm-negativen Tieren, sehr vereinzelt angefärbte Zellen gefunden wurden. Diese Methode eignet sich damit nicht, SIVagm-positive mit Sicherheit von SIVagm-negativen Tieren zu diskriminieren. Es war nicht möglich einen geeigneten Primärantikörper zu finden, der eine ausreichende Spezifität aufgewiesen hätte.

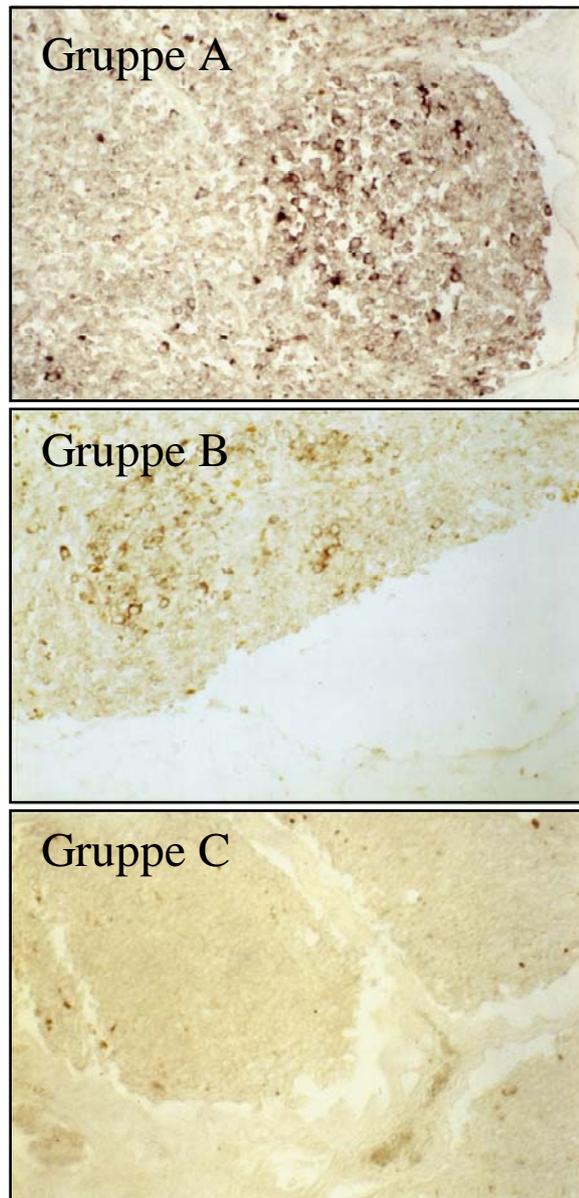


Abb. 14: Immunhistochemische Analyse von AGM-Lymphknoten vier Wochen nach experimenteller SIVagm-Infektion mit poloyklonalem Antiserum gegen SIVagm.

3.2.9.3. *In-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von SIVagm-RNA in Lymphknoten*

Mit Hilfe der neu etablierten In-situ-Hybridisierungstechnik, basierend auf dem nicht-radioaktiven DIG-System, ist die spezifische Detektion von SIVagm-RNA in morphologisch konservierten Gewebeschnitten möglich. In Kombination mit immunhistochemischen Methoden gibt die ISH mikroskopisch Aufschluß über die Topographie der Virus-RNA. Die dazu eingesetzte Sonde hybridisiert in der LTR-Region von SIVagm und wurde nach Klonierung der Template-DNA mittels in vitro-Transkription hergestellt. Zeitgleich fand dabei eine Markierung mit Digoxigenin statt.

Diese Methode dient dem Nachweis von infizierten Zellen und der Detektion von extrazellulär vorliegender viraler RNA in Lymphknoten. Ziel war es, mit Hilfe dieser Technik die Topographie von SIVagm-RNA zu bestimmen. Wichtig war dabei, eine Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulär vorliegender RNA treffen zu können.

Theoretisch sollte diese Unterscheidung durch die Art der Anfärbung möglich sein. Ausgehend davon, daß intrazelluläre SIV-RNA zu einer scharf konturierten Anfärbung der Zelle führt, und dies nicht nur in Sekundärfollikeln sondern auch in anderen Bereichen der Rinde und die Färbung von Viruspartikeln zu einer diffusen Färbung, ausschließlich in den Follikeln, sollte diese Unterscheidung möglich sein.

Die Spezifität der Sonde sollte durch den Einsatz einer Positivkontrolle, SIVagm-infizierte C8166-Zellen bzw. Negativkontrolle, SIVagm-negative C8166-Zellen nachgewiesen werden. Als weitere Kontrolle diente der Einsatz der Sense-Sonde, die nicht in der Lage sein sollte, mit viraler RNA zu hybridisieren. Somit könnte ausgeschlossen werden, daß es zu einer RNA-DNA-Hybridbildung kommt, d.h. provirale Sequenzen nachgewiesen würden.

Betrachtet man die Lymphknotenschnitte der Gruppe A, so stellt sich der spezifische Nachweis der RNA nach immunchemischer Detektion als dunkelviolette Färbung dar (siehe Abb.15). Der z.T. auftretende schwarze Niederschlag kann vernachlässigt werden. Deutlich sichtbar stellt sich eine dunkelviolette Färbung in den Sekundärfollikeln dar. Bei allen Tieren der Gruppe A konnte virale RNA im Bereich der Rinde, insbesondere in den Sekundärfollikeln nachgewiesen werden. Verglichen mit der Positivkontrolle, d.h. SIVagm-positiven C8166-Zellen, ist die Anfärbung der einzelnen Viruspartikel nicht als sehr stark zu bezeichnen.

Auffällig ist bei zwei Tieren (AGM 212 und 97) eine diffuse Färbung des gesamten Follikels. Die anfärbten Follikel stellen sich hier nicht scharf konturiert dar. Prinzipiell würde man diese Form der Anfärbung erwarten, wenn es sich nicht um die Darstellung infizierter Zellen, sondern um den Nachweis von extrazellulär vorliegenden Viruspartikeln handelt. Dies könnte ein erster Hinweis auf die Anheftung von Viruspartikeln auf der Oberfläche von FDC sein.

Deutlich war die Negativkontrolle der Sense-Sonde. Sie zeigte deutlich das gewünschte Resultat, d.h. in keiner untersuchten Probe konnte ein Signal detektiert werden. Somit kann ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um den Nachweis von Provirus handelt. Diese eindeutige Unterscheidung war für die Fragestellung unerlässlich.

Auch bei Gruppe B konnten im Bereich der Rinde, insbesondere im Bereich der Follikel, infizierte Zellen nachgewiesen werden, jedoch erheblich weniger als bei Gruppe A. Eine, wie bei Gruppe A beschriebene diffuse Färbung des gesamten Follikels konnte nicht gefunden werden. Alle angefärbten Zellen stellten sich scharf konturiert dar.

Bei Betrachtung der Gruppe C, der Negativkontrollgruppe, wird deutlich, daß die Hintergrundfärbung zum Teil hoch ist. Insbesondere bei AGM 198 wird das sichtbar. Die Technik bedarf deshalb weiterer Optimierungsschritte. Prinzipiell war es bei dieser Studie möglich, SIVagm-positive und SIVagm-negative Tiere zu diskriminieren. Dabei darf aber nicht ausser Acht gelassen werden, daß keines der Tiere aus Gruppe C zum Zeitpunkt der Lymphknotenentnahme eine Bildung von Sekundärfollikeln aufwies. Ob sich dies begünstigend ausgewirkt hat bzw. ob die Infektion mit einem anderen Erreger und die damit verbundene Follikelbildung eher zu einem unspezifischen Signal geführt hätte, kann derzeit nicht geklärt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der ISH der Lymphknoten, die vier Wochen nach Challenge entnommen wurden (siehe Abb. 15), mit den Lymphknoten der ein Jahr später stattfindenden Entnahme (siehe Abb. 16), kann bei zwei Tieren der Gruppe A kein Unterschied festgestellt werden. Hingegen zeigte sich bei AGM 212 und 97 eine deutlich schwächere Färbung der Follikel bei den später entnommenen Organen. Auch die zuvor aufgezeigte diffuse Färbung der Sekundärfollikel konnte nicht mehr beobachtet werden.

Bei Gruppe B konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten festgestellt werden. Nur AGM 163 zeigt etwas mehr infizierte Zellen. Gruppe C ist auch ein Jahr später noch negativ.

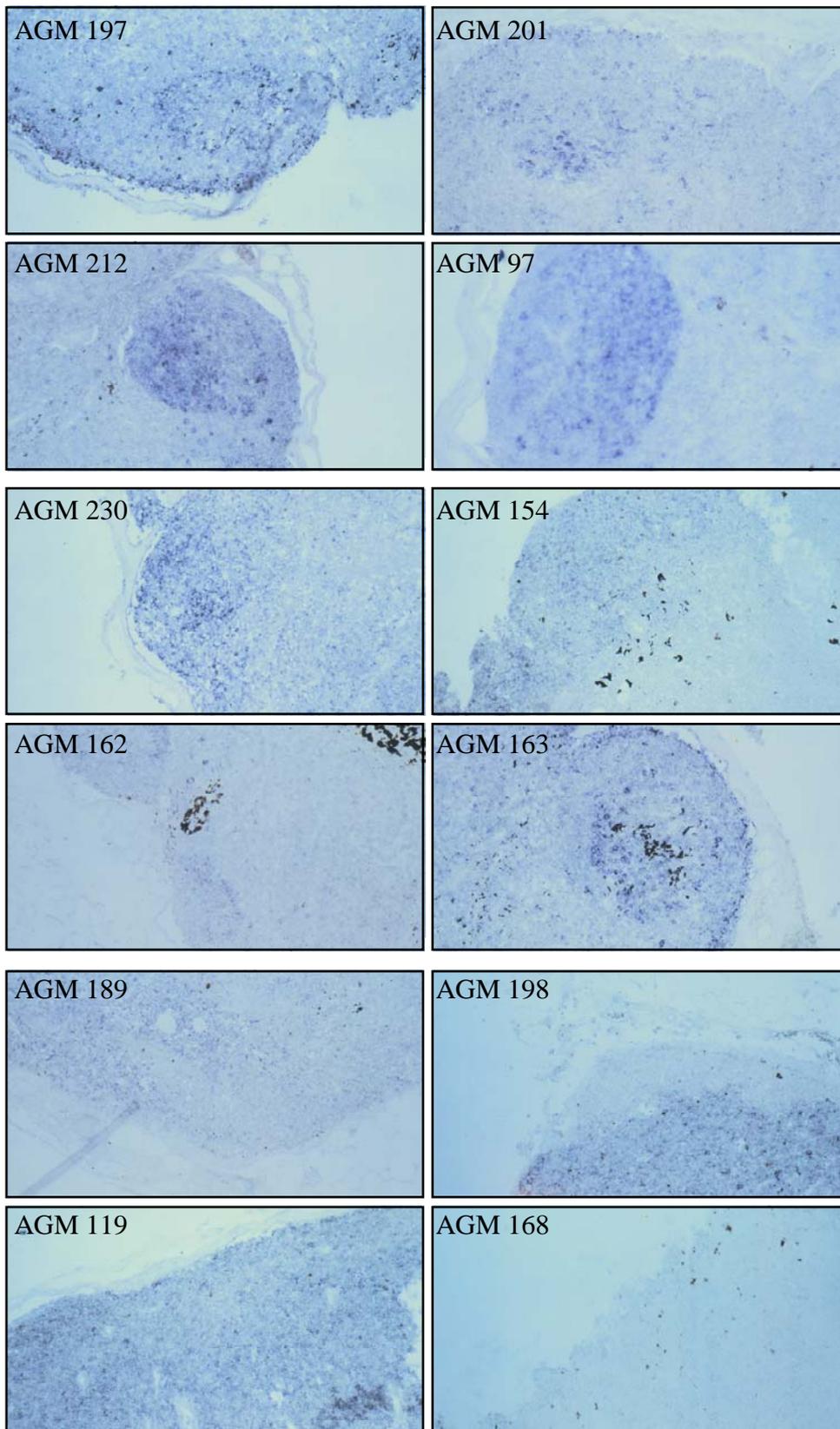


Abb. 15: In-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer DIG-markierten Antisense-Sonde, zum Nachweis von intra- und extrazellulär vorliegender viraler RNA in Lymphknoten von SIVagm-infizierten Tieren, vier Wochen nach Belastung.

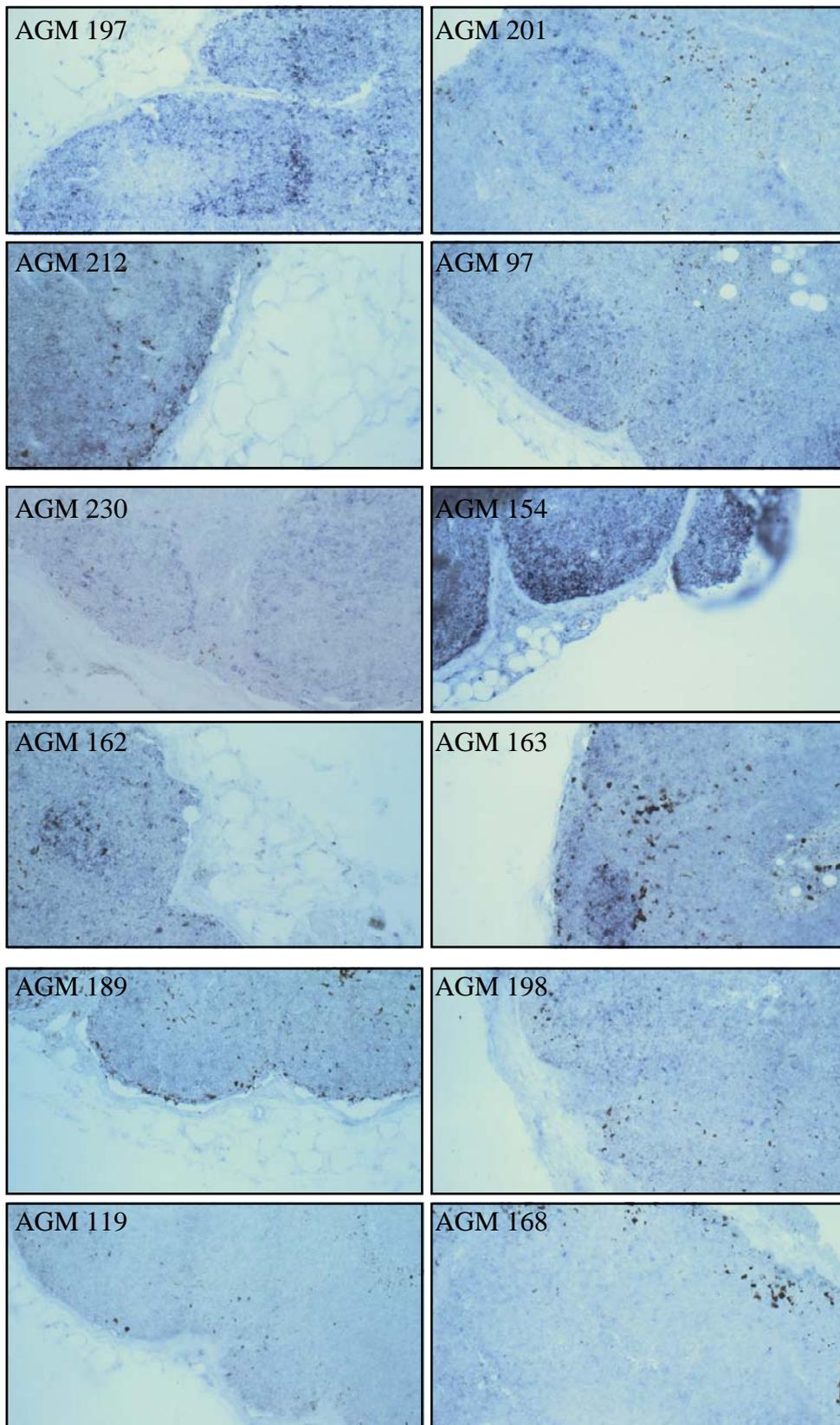


Abb. 16: In-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer DIG-markierten Antisense-Sonde, zum Nachweis von intra- und extrazellulär vorliegender viraler RNA in Lymphknoten von SIVagm-infizierten Tieren, ein Jahr nach Belastung.

3.2.9.4. Nachweis von Follikulär Dendritischen Zellen

Während der HIV-Infektion kommt es zu einer Vergrößerung und einer Vermehrung der Lymphfollikel, den Stätten der humoralen Immunantwort und nachfolgend beginnt die Krankheitsprogression. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu einer Zerstörung der Follikulär Dendritischen Zellen, die als dreidimensional angeordnetes Maschenwerk, für die Antigenpräsentation der T- und B-Zellen zuständig sind. Die Zerstörung der FDC ist assoziiert mit der verstärkten Ablagerung von HIV in den Lymphknoten. Sie beginnt bei der HIV-Infektion schon in der präsymptomatischen Phase und schreitet progressiv fort.

Ziel war es, im Rahmen der Gag-Studie ein Testsystem zu etablieren, welches die spezifische Detektion von FDC von AGM zulässt. Von Interesse war dabei, neben dem Vergleich Gruppe A/ Gruppe B, festzustellen, ob prinzipiell eine Änderung des FDC-Maschenwerks im Verlauf der Infektion stattfindet.

Während der Etablierungsphase wurden verschiedene monoklonale Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis der FDC getestet. Positive Signale konnten letztendlich mit einem Antikörper gegen humanes CD35 (Rezeptor für das humane Komplementfragment CR1) gefunden werden. Dieser Rezeptor wird in großen Mengen von FDC expremiert und stellt somit ein spezifisches Nachweissystem dar. Gewählt wurde eine Peroxidase-Färbung, bei der sich das positive Signal als Braunfärbung darstellt.

Die FDC stellten sich hier sehr deutlich als braungefärbtes „Maschenwerk“ in den Sekundärfollikeln dar. Eine Veränderung während des Infektionsverlaufs bzw. ein Unterschied zwischen Gruppe A, B und C konnte nicht dokumentiert werden. Auch bei chronisch infizierten AGM kann keine Zerstörung des FDC-Netzwerkes beobachtet werden (persönliche Mitteilung von M. Müller-Trutwin). Es wurde deshalb darauf verzichtet, alle Daten zu zeigen und demzufolge wird eine repräsentative Darstellung gezeigt. Es handelt sich hierbei um einen Gefrierschnitt, da es leider nicht möglich war, das Testsystem für Paraffinschnitte zu etablieren.

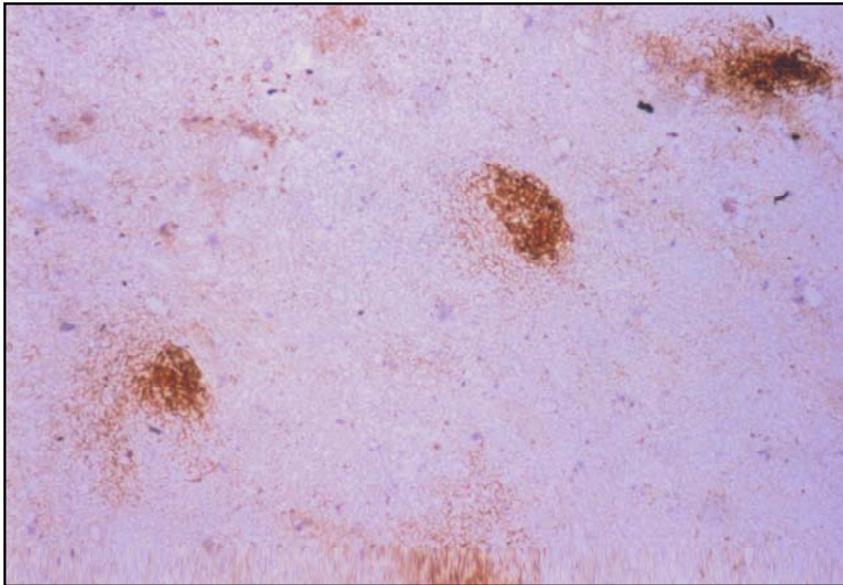


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) in Lymphfollikeln von AGM unter Verwendung eines monospezifischen Antikörpers gegen CD 35.

3.2.9.5. Überprüfung der unspezifischen Immunantwort

In vivo liegt HIV-1 mit Komplementfragmenten und virusspezifischen Antikörpern opsonisiert vor. Somit ist HIV in der Lage, mit Komplementrezeptor- und Fc-Rezeptor-positiven Zellen, wie FDC, zu interagieren. Da es während der SIVagm-Infektion von AGM nicht zu einer Bindung von Viruspartikeln auf der Oberfläche von FDC kommt, sollte im folgenden untersucht werden, ob das Serum von AGM ex vivo in der Lage ist, SIVagm zu opsonisieren bzw. wie sich dies mit Seren anderer Primatenspezies verhält. Dazu wurde SIVagm mit Seren von AGM, *M. nemestrina*, Pavian, Cynomolgen und Rhesusaffen inkubiert. Ein Nachweis der stattgefundenen Opsonisierung, d.h. der Beladung des Virus mit Fragmenten des Komplements C3c und C3d sollte durch einen Ag-Capture-Assay und einem sich anschließenden ELISA erbracht werden.

Die mittels ELISA erstellten Daten ließen keinen Unterschied zwischen den verschiedenen eingesetzten Primaten-Seren erkennen. Die detektierten OD-Werte variierten innerhalb einer Spezies und untereinander etwa in der gleichen Größenordnung. Aufgrund der Datenlage ist davon auszugehen, daß zumindest Gesamtvirus prinzipiell auch in vivo opsonisiert wird, ähnlich wie SIVmac in Rhesusaffen bzw. HIV in Menschen. Darüber ob dies auch für Gag-Partikel gilt, kann keine Aussage getroffen werden.

4. Diskussion

Afrikanische Grüne Meerkatzen (AGM, *Chlorocebus*) sind nur eine von vielen afrikanischen Primatenspezies, die während der gesamten adulten Lebensspanne mit einem Immundefizienzvirus infiziert sind.

Im Verlauf einer SIVagm-Infektion zeigen weder natürlich noch experimentell infizierte AGM, im Gegensatz zu HIV-infizierten Menschen (Fauci, 1988) oder SIVmac-infizierten Makaken (Desrosiers *et al.*, 1989; Norley und Kurth, 1992), Symptome einer Immunschwäche (Baier *et al.*, 1991; Kraus *et al.*, 1989; Norley *et al.*, 1990a).

Große Anstrengungen wurden deshalb in der Vergangenheit unternommen, um zu klären, warum der natürliche Wirt des Virus zeitlebens nicht an einer Immundefizienz erkrankt.

Ursprünglich wurde das simiane Immundefizienzvirus SIVagm aus seinem natürlichen Wirt, der AGM, isoliert (Daniel *et al.*, 1988; Kraus *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1988). SIVagm zeigt fast die gleiche genomische Organisation wie HIV und fällt phylogenetisch in eine Gruppe mit HIV-1. Die humorale und zelluläre Immunantwort SIVagm-infizierter AGM ist zum Teil unterschiedlich im Vergleich zu HIV-1-Infektion des Menschen. Es wurden zwar ADCC-vermittelnde Antikörper gefunden und in natürlich infizierten Wildfängen wurden Virusstamm-spezifische neutralisierende Antikörper detektiert (Gicheru *et al.*, 1999), aber bislang konnten keine Komplement-aktivierenden Antikörper gefunden werden. Es ist nicht davon auszugehen, daß eine starke humorale Immunantwort für den benignen Verlauf dieser chronischen Infektion verantwortlich ist. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, daß die CTL-Antwort stärker ist, als die HIV-1-infizierter Menschen und somit verantwortlich wäre für den Schutz vor Krankheit, da die CTL-Antwort gegen HIV sowohl in der akuten als auch in der asymptomatischen Phase sehr stark ausgeprägt ist (Gotch *et al.*, 1990; Hoffenbach *et al.*, 1989; Venet *et al.*, 1992). Ein einziger CTL-Klon kann 1-3% der aktivierten zirkulierenden T-Lymphozyten betragen (Moss *et al.*, 1995). Der Zelltropismus der beiden Lentiviren ist vergleichbar und auch die in vivo Variabilität von HIV und SIVagm zeigt keine signifikanten Unterschiede (Baier *et al.*, 1989; Fomsgaard *et al.*, 1991). Daß es sich bei SIVagm nicht per se um ein apathogenes Virus handelt, konnte durch Infektion einer heterologen Spezies (*M. nemestrina*) gezeigt werden (Hirsch *et al.*, 1995). Einige dieser Tiere entwickelten nach Infektion mit bestimmten SIVagm-Isolaten SAIDS.

Tetanusstimulationsstudie

Als wichtiger Parameter für den Verlauf der HIV-Infektion in Menschen wird die Virusbelastung angesehen. Die Höhe korreliert mit der Progression der Krankheit (Coombs *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989). Auch der Krankheitsbeginn ist direkt mit der Viruslast der akuten Phase assoziiert (Mellors *et al.*, 1996). Dieser Zusammenhang zwischen Virusbelastung und Krankheitsprogression konnte auch für die SIVmac-Infektion in Rhesusaffen gezeigt werden (Hirsch *et al.*, 1996; Staprans *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1997). Offensichtlich existiert ein „Schwellenwert“. Wird dieser überschritten, entwickeln die Makaken SAIDS. Verbleibt die Virusbelastung darunter, kommt es nicht zum Krankheitsausbruch (Ten Haaft *et al.*, 1998). Bislang lag deshalb der Fokus vieler Untersuchungen des apathogenen SIV/Primaten Systems auf der Suche nach einem oder mehreren antiviralen Mechanismen, die in der Lage sind, die Virusreplikation auf ein „apathogenes Niveau“ zu regulieren. Ein interessanter Hinweis darauf könnte die außergewöhnliche CD4/CD8-Ratio sein, die in AGM gefunden wurde. Diese Spezies zeigt mit ca. 10% CD4-Zellen (Ennen *et al.*, 1994a; Ennen *et al.*, 1994b) eine deutlich niedrigere CD4/CD8-Ratio als Rhesusaffen, die eine Immundefizienz entwickeln und einen CD4-Anteil von 25% besitzen (Hartung *et al.*, 1992). Die meisten peripheren CD4-Zellen in AGM zeigen eine niedrige Ko-Expression von CD8-Antigen. Nach Lymphozyten-Aktivierung *in vitro* verschwindet die CD4-Expression der CD4/CD8^{low}-Zellen und diese sind nach ihrer Konversion in CD4⁺/CD8⁺-Zellen resistent gegenüber einer SIV-Infektion (Beer *et al.*, 1998; Murayama *et al.*, 1997). Welchen Beitrag diese Tatsache zur Apathogenität von SIV in AGM leistet, ist bislang nicht geklärt. Cocchi *et al.* (1995) konnten zeigen, daß drei von CD8-Zellen sezernierte Chemokine (Rantes, MIP-1 α und MIP-1 β) in HIV-infizierten Menschen *in vitro* in der Lage waren, die HIV-Replikation zu supprimieren. Ebenso konnte ein von CD8-Zellen sezernierter SIVagm-inhibierender Faktor in AGM gefunden werden (Ennen *et al.*, 1994a; Ennen *et al.*, 1994b). Als weiterer HIV-inhibierender Faktor wurde Interleukin-16 (IL-16) identifiziert (Baier *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß humanes und simianes IL-16 in der Lage sind, die Replikation von HIV-1 in humanen PBMC zu inhibieren. Frühere Studien geben jedoch keinen Hinweis darauf, daß der von AGM CD8⁺-Zellen produzierte antivirale Faktor in der Lage ist, die Virusreplikation effektiver zu inhibieren.

Es konnte bislang kein Mechanismus ausgemacht werden, der in der Lage ist, die Virusreplikation zu kontrollieren. Auch ist nicht klar, ob es sich um einen immunologischen oder

nicht-immunologischen Mechanismus handelt. Folgende Hypothese sollte deshalb untersucht werden: Eine exogene Immunstimulation führt zu einem Anstieg an aktivierten Zielzellen für SIVagm. Verläuft die Virusreplikation immunkontrolliert, so kommt es auch bei einem Anstieg aktivierter Zielzellen nicht zu einem Anstieg der Virusbelastung. Findet keine kontrollierte Virusreplikation statt, steigt die Virusbelastung mit der Vermehrung der Zielzellen an und sinkt parallel mit der Anzahl der CD4⁺-Zellen wieder ab.

Verschiedene Studien konnten zeigen, daß der Grad der Immunaktivierung im Zusammenhang steht mit dem Verlauf einer SIV-Infektion (Popov *et al.*, 1992) und daß eine Assoziation zwischen dem Aktivierungsstatus und einer veränderten Regulation von HIV-1 in infizierten Menschen besteht (Claydon *et al.*, 1991; Fultz *et al.*, 1992; Ho, 1992; O'Brien *et al.*, 1995; Schwiebert und Fultz, 1994; Staprans *et al.*, 1995). Eine Aktivierung des Immunsystems durch einen exogenen Antigen-Stimulus wie Tetanustoxoid führte in HIV-infizierten Menschen zu einem transienten Anstieg der Virusreplikation und es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß HIV-negative PBMC eine erhöhte Suszeptibilität aufwiesen (Stanley *et al.*, 1996).

Es sollte deshalb geklärt werden, ob und in welcher Form eine Immunstimulation auf den Immunstatus bzw. die Virusbelastung SIVagm-infizierter AGM Einfluß nimmt. Dazu wurden vier SIVagm-infizierte AGM, die zwei Jahre zuvor eine Basisimmunisierung mit Tetanustoxoid erfahren hatten, zweimal im Abstand von vier Wochen mit Tetasorbat geboostert. Vor und während der Immunstimulationsbehandlung wurden Immunparameter wie die Leukozyten- bzw. Lymphozytengesamtzahl, die Lymphozytenproliferationskapazität und mittels FACS die Aktivierungsmarker bestimmt. Ebenso wurde die zellassozierte Viruslast und Plasmavirusbelastung gemessen.

Die erste Auffälligkeit ergab sich aus der Tatsache, daß die gemessenen Leuko- bzw. Lymphozytenwerte keinen Anstieg nach erfolgter Immunisierung zeigten. Diese Werte stimmten mit der untersuchten Lymphozytenproliferationskapazität, die Stimulation *in vitro* erfolgte mit Tetanustoxoid, überein. Auch hier konnten nur sehr niedrige Stimulationsindizes gemessen werden. Weder die zellassozierte Virusbelastung noch die mittels PERT-Test gemessene RT-Aktivität, welche die Plasmavirusbelastung widerspiegelt, zeigte eine Änderung. Die wiederholte Immunisierung der Tiere mit Tetasorbat zwei Jahre nach Basisimmunisierung hatte auf keinen der untersuchten immunologischen oder virologischen Parameter einen Einfluß.

Der Zeitpunkt der SIVagm Infektion lag vor der Basisimmunisierung. Somit wäre es möglich, daß die antigen-vermittelte Aktivierung durch Tetanustoxoid, d.h. diese exogene Stimulation, zu einer Proliferation der CD4⁺-Zellen und damit zu einer Vermehrung der Zielzellen von SIVagm geführt hat. Möglicherweise wurden diese aktiviert vorliegenden Zellen infiziert und nachfolgend eliminiert. Somit wären keine Gedächtniszellen verblieben und dementsprechend wäre die Immunisierung zwei Jahre später ineffektiv. Es kann aufgrund dieses Versuchsschemas keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob eine Stimulation des Immunsystems Einfluß nimmt auf den Immunstatus bzw. die Virusbelastung SIVagm-infizierter AGM. Zukünftig muß wiederholt werden, die Versuchstiere vor Infektion mit SIVagm mit Tetanustoxoid zu immunisieren und danach die Boost-Immunisierungen durchzuführen. Damit kann ausgeschlossen werden, daß eine Immunstimulation deshalb ineffektiv bliebe, weil zuvor die spezifischen Gedächtniszellen eliminiert wurden. Eine solche Studie ist besonders zur Gegenüberstellung mit einer zuvor durchgeführten Immunsuppressionsstudie (Diplomarbeit, Silke Holzammer) interessant. In diesem Projekt sollte geklärt werden, ob die gezielte Suppression des Immunsystems einen Einfluß auf die Virusbelastung der AGM hat bzw. ob die Virusreplikation durch das Immunsystem kontrolliert wird. Dazu wurde eine Gruppe von vier AGM untersucht, die über einen Zeitraum von neun Tagen mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG, Fresenius) behandelt wurde. Basiswerte wurden vier Monate vorher und immunologische Parameter für zwei Monate im Anschluß bestimmt. Die zellassozierte Virusbelastung blieb unauffällig; hingegen konnten bei der peripheren Plasmavirusbelastung drastische Änderungen beobachtet werden. Nach ATG-Gabe kam es bei allen AGM zunächst für einen Zeitraum von etwa zwei Wochen zu einem Rückgang der Plasmavirusbelastung um etwa ein bis drei Zehnerpotenzen. Dies ging einher mit einer starken Lymphozytopenie und damit auch zu einem drastischen Verlust der Wirtszellpopulation. Gleichzeitig sank in diesem Zeitraum die zellassozierte Virusbelastung. Nach Absetzen des Immunsuppressivums kam es aber zu einem dramatischen Anstieg der Plasmavirusbelastung. Bei allen AGM konnten Virusmengen im Plasma detektiert werden, die mit etwa drei bis fünf Zehnerpotenzen deutlich über den Ausgangswerten lagen. Die Maximalwerte hielten etwa eine Woche an, um dann wieder auf den Ausgangswert zu sinken. Parallel dazu stiegen auch die Lymphozytenwerte auf Normalwerte an. Die Immunsuppression konnte transient einen deutlichen Anstieg der Virusbelastung induzieren und unterliegt somit äußeren Einflüssen. Welche Ursachen sind verantwortlich für den, nach

Ende der ATG-Behandlung stattfindenden, drastischen Anstieg der Virusbelastung? Prinzipiell sind dafür zwei Möglichkeiten denkbar:

Die ansteigende Virusbelastung kann mit der Tatsache zusammenhängen, daß die Lymphozyten nach Absetzen des Anti-Thymozyten-Globulins zunächst besonders stark proliferieren, um eine schnellst mögliche Rekonstitution des Immunsystems herbeizuführen, ein sog. „Rebound-Effekt“. Damit stünden dem SI-Virus besonders viele aktivierte Zielzellen zur Verfügung, d.h. deutlich mehr als im unbehandelten Zustand vor ATG-Gabe. Dies stimmt mit den dokumentierten Daten überein und würde dafür sprechen, daß die Virusreplikation nicht immunkontrolliert abläuft, sondern sich nach der Menge der Zielzellen richtet.

Denkbar wäre auch folgender Verlauf:

Der Anstieg der Virusbelastung steht in direktem Zusammenhang mit der Suppression des Immunsystems. Dem Immunsystem ist es nach Unterdrückung durch die ATG-Behandlung nicht mehr möglich, die Replikation zu limitieren und auf einem nicht-pathogenen Niveau zu halten. Mit dem Ende der Behandlung steigt die Zahl an Zielzellen an, was den drastischen Anstieg der Viruslast erklärt. Mit Regeneration des Immunsystems und damit auch wieder steigender Zahl CD8⁺-Zellen und Sekretion von Zytokinen und IL-16 sinkt die Virusbelastung auf ihren Ausgangswert. Das Immunsystem ist in der Lage, die Virusreplikation effektiv zu limitieren.

Diese kontrovers diskutierbaren Daten lassen keine eindeutige Klärung zu. Es handelt sich bei den zu untersuchenden Immunzellen gleichzeitig um die Zielzellen des Virus. Ob der Anstieg der Virusbelastung immunkontrolliert abläuft oder einfach einem Sättigungsprinzip folgt, d.h. direkt korreliert mit der Anzahl Zielzellen kann mit dieser Studie alleine nicht geklärt werden.

Um die zelluläre Immunität in AGM zu testen, wäre es deshalb besser, alternativ zum Einsatz von ATG mittels anti-CD8 Antikörper eine CD8-Depletion zu induzieren. Die Zielzellen blieben bei dieser Art der Immunsuppression unbeeinflusst. Schmitz *et al.* (1999) konnten zeigen, daß die zelluläre Immunität SIV-infizierter Rhesusaffen während der akuten und chronischen Phase die HIV-Replikation kontrolliert. Während der chronischen Phase zeigten SIV-positive Rhesusaffen nach CD8-Depletion einen sehr viel schnelleren und stärkeren Anstieg der Virämie, welche mit Rekonstitution der SIV-spezifischen CD8-T-Zellen wieder zurückging. Für die CD8-Depletion wurde ein chimärer monoklonaler CD8-spezifischer Antikörper (cM-T807) eingesetzt.

Weiterhin wäre es interessant, die Immunstimulation mittels Tetanustoxoid unter den zuvor beschriebenen veränderten Bedingungen zu wiederholen. Verhielte es sich tatsächlich so, daß die Höhe der Virusbelastung direkt assoziiert ist mit der Anzahl der Zielzellen und somit die Virusreplikation nicht immunkontrolliert wäre, so müsste eine Immunstimulation und demzufolge eine Vermehrung von aktivierten SIVagm-Zielzellen eine erhöhte Virusbelastung mit sich bringen. Unwahrscheinlich wäre dann, daß ein antiviraler Faktor die Replikation limitieren könnte, denn dieser müsste bei einer Stimulation des Immunsystems ebenfalls vermehrt vorliegen bzw. in der Lage sein die Virusbelastung zu regulieren.

Gag-Studie

Obwohl die Ursache für den benignen Verlauf der SIVagm-Infektion in AGM nach wie vor unklar ist, konnten doch potentiell sehr wichtige Unterschiede zwischen pathogenen und apathogenen Systemen gefunden werden.

Während der HIV-Infektion des Menschen und SIVmac-Infektion von Makaken ist die Virusbelastung in den Lymphknoten sehr viel höher als im Blut (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993). Dabei scheint es, daß ein Großteil der Virusbelastung als Viruspartikel gebunden an der Oberfläche von Lymphknotenzellen, d.h. Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) vorliegt (Schmitz *et al.*, 1994). Die HIV-Infektion geht zunächst einher mit einer dramatischen Änderung der Histopathologie der Lymphknoten. Einer follikulären Hyperplasie mit Zunahme des Maschenwerks der FDC folgt eine progressive Zerstörung der germinalen Zentren und führt schließlich zu einer Zerstörung der Lymphknotenarchitektur (Janossy *et al.*, 1985; Piris *et al.*, 1987; Tenner-Racz *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1985). Möglicherweise als Resultat des sog. „Virus-trapping“, d.h. der Anheftung von Viruspartikeln auf der Oberfläche von FDC, kommt es im Verlauf der Krankheitsprogression zu einer Zerstörung der Lymphknotenarchitektur und zeitgleich zu einem Funktionsverlust der Lymphknoten. Ob dies der Grund für die Krankheitsentstehung ist oder ein Resultat dessen ist nicht geklärt. Interessant ist in diesem Kontext, daß selbst aus AGM, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren SIVagm infiziert waren nur eine geringe Anzahl infizierter Zellen aus Lymphknoten isoliert werden konnte. Die Höhe der Virusbelastung in Lymphknoten ist vergleichbar mit der der PBMC. Auch kommt es bei AGM nicht zu einer Zerstörung der Lymphknotenarchitektur bzw.-struktur, diese Organe bleiben intakt. Ungewöhnlich ist auch, daß SIVagm-infizierte AGM, die in der Zirkulation eine

relativ hohe Virusbelastung aufweisen, keine Zeichen von Virus-trapping aufzeigen (Beer *et al.*, 1996).

Besonders auffällig ist weiterhin, daß AGM nur sehr schwach oder gar keine Antikörper gegen intaktes Gag-Protein bilden. Im Gegensatz dazu bilden heterologe Spezies sehr hohe Titer gegen das Kernprotein von SIVagm (Norley *et al.*, 1990a). In Anbetracht der Tatsache, daß hohe Konzentrationen von SIV in der Zirkulation vorliegen und hohe Antikörper-Titer gegen das Envelope-Glykoprotein existieren, muß davon ausgegangen werden, daß genug Gag-Protein vorliegt um die normale Immunantwort zu stimulieren. Daß alle Gag-Antikörper gebunden in Immunkomplexen vorliegen und deshalb mit serologischen Tests nicht mehr detektierbar wären, ist unwahrscheinlich. Frühere Tests, Gag-spezifische Antikörper zu detektieren blieben auch nach Dissoziation der Immunkomplexe negativ (Norley, persönliche Mitteilung). Denkbar wäre aber auch, daß diese Primatenspezies aufgrund gemeinsamer Evolution mit dem Virus eine Art Immuntoleranz gegen das Protein gebildet hat. Es stellt sich die Frage, ob diese beiden Phänomene, das Ausbleiben einer humoralen Immunantwort gegen Gag-Protein und das fehlende Virus-Trapping in Lymphknoten miteinander assoziiert sind. Bekannt ist, daß bei der HIV-1-, SIVmac und der SIVagm-Infektion nur ein kleiner Anteil der zirkulierenden Partikel wirklich infektiös ist. Möglicherweise besteht ein Großteil der Partikel aus hüllenlosen, viralen Kernen. HIV-1 und SIVmac-Partikel würden von Gag-Antikörpern bedeckt, eventuell auch opsonisiert und könnten via Fc-oder Komplement-Rezeptor auf der Oberfläche von FDC gebunden werden. Dafür sprechen die mittels ISH nachgewiesenen großen Mengen viraler RNA auf der Zelloberfläche, deutlich diskriminierbar von intrazellulärer RNA (Schmitz *et al.*, 1994). Dies wiederum könnte zu einer immunpathologischen Attacke führen und erklärte die hohe Apoptoserate der Zellen. Die Überladung der Lymphknoten mit viralen Immunkomplexen würde die Reparaturkapazitäten überfordern und die Lymphknotenstruktur würde zerstört. Es konnte gezeigt werden, daß es mit Ausbruch der Krankheit zu einem Anstieg der Viruslast kommt. Diese wird aber zunächst noch im lymphatischen Gewebe zurückgehalten solange die Struktur der Keimzentren intakt ist. Zeitgleich mit einem Anstieg der peripheren Viruslast kann eine Zerstörung der Follikel beobachtet werden (Pachl *et al.*, 1995).

Im apathogenen System hingegen, in dem keine Antikörper gegen das Kernprotein vorliegen, könnten demzufolge auch keine viralen Immunkomplexe gebildet werden. Dementsprechend könnten Viruspartikel den Lymphknoten passieren und zurück in die Zirkulation gelangen. Dies

würde das fehlende Virus-Trapping in Lymphknoten erklären. Bemerkenswert ist, daß dies auch für weitere natürliche Wirte von SIV, wie SIVsm-infizierte Sooty mangabeys und SIVhoest-infizierte L'hoest monkeys, gezeigt werden konnte.

Prinzipiell läßt sich diese Hypothese mit verschiedenen Strategien überprüfen.

Im Rahmen der nachfolgenden Studie sollte zunächst geklärt werden, ob eine experimentelle Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das Kernprotein von SIVagm möglich ist. Dazu wurden die Tiere mehrfach mit nativem Gag-Protein immunisiert. Im Anschluß daran wurden die Tiere experimentell mit SIVagm infiziert und in regelmäßigen Abständen erfolgten Blutentnahmen bzw. Lymphknotenentnahmen. Ziel war es, nach erfolgter Induktion von Gag-Antikörpern, zu überprüfen, ob die Existenz dieser Immunglobuline Einfluß auf den Verlauf der Infektion nimmt. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Untersuchung der Lymphknoten und der Plasmavirusbelastung. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Bildung von Gag-Antikörpern ein Virus-Trapping in Lymphknoten ermöglicht bzw. ob dies zu einer Änderung der Lymphknotenstruktur bzw.-architektur führen kann. Ebenso sollte geprüft werden, ob die Plasmavirusbelastung in diesem Kontext eine Änderung erfährt. Möglicherweise könnte eine Anreicherung von Immunkomplexen in den Lymphknoten zu einer reduzierten Plasmavirusbelastung führen. Untersucht wurde deshalb zum Vergleich der Infektionsverlauf in einer nicht-Gag-immunisierten Kontrollgruppe. Die Lymphknoten wurden histologisch untersucht und mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) sollte Virus-Trapping nachgewiesen werden.

Die mit Gag-Protein immunisierten Tiere zeigten schon nach vier bis sechs Wochen eine humorale Immunantwort gegen das Kernprotein. Nach der dritten Immunisierung erreichten die Antikörper-Titer mit 1:10.000 ihr Maximum. Daß es so leicht war, eine Antikörperantwort zu induzieren, überraschte zunächst. Offensichtlich liegt hier keine natürliche Toleranz gegen das Kernprotein von SIVagm vor. Die Immunisierung wurde mit hohen Dosen Proteins durchgeführt und erzielte schnell einen Erfolg. Diese Beobachtungen sprechen nicht dafür, daß das Fehlen der Antikörper in natürlich SIVagm-infizierten AGM auf einer wirklichen Toleranz beruht.

Die Tatsache, daß die Antikörper-Titer nach experimenteller Infektion wieder abfielen spricht dafür, daß die humorale Immunantwort natürliches Gag-Protein nicht erkennt. Das Fehlen einer anamnestic Immunantwort nach Infektion läßt darauf schließen, daß verschiedene Mechanismen des Immunsystems bei der Erkennung von injiziertem und *in vivo* produziertem

viralem Gag-Protein involviert sind. Worauf sich dies begründet ist derzeit unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zumindest war somit das erste Ziel, die Bildung von Gag-Antikörpern in AGM, erreicht und die Tiere konnten nachfolgend mit SIVagm infiziert werden. Um die SIVagm spezifische humorale Immunantwort zu testen, unabhängig von Gag-spezifischen Antikörpern, wurden Env-Antikörper-Titer gemessen. Gruppe A, d.h. die Gag-immunisierte Gruppe, und Gruppe B, die Gruppe die keine Immunisierung vor der Infektion erfahren hatte, zeigten diesbezüglich keine Unterschiede. Bei beiden Gruppen wurde ein Verlauf beobachtet, wie er bereits mehrfach beschrieben wurde, d.h. etwa vier Wochen nach Infektion konnte bei allen Tieren die höchste Titerstufe detektiert werden. Die schon vor der Infektion existierenden Antikörper gegen das Kernprotein hatten keinen Einfluß auf die Bildung der Env-Antikörper.

Während der gesamten Studiendauer wurde das Ausmaß der zellassozierten Virusbelastung untersucht. Auch hier entsprach die Datenlage bereits beschriebenen Werten, und es konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen dokumentiert werden. Die maximale zellassozierte Virusbelastung existierte etwa zwei Wochen nach Immunisierung. Die Werte fielen dann z.T. so stark ab, daß sie unter der Nachweisgrenze lagen. Ein besonderer Fokus der Studie lag auf der Plasmavirusbelastung während des Infektionsverlaufs. Ausgehend davon, daß die Lymphknoten bei SIVagm-positiven AGM nicht, wie bei der HIV-Infektion des Menschen oder SIVmac-Infektion von Rhesusaffen, als Virusreservoir fungieren, sollte geklärt werden, ob die Existenz von Gag-Antikörpern einen Einfluß auf die periphere Viruslast nimmt. Käme es im Verlauf der Infektion zu einem Virus-Trapping, könnte es damit theoretisch zu einer Akkumulation von Viruspartikeln in den Lymphknoten kommen und die periphere Viruslast der Gruppe A wäre möglicherweise gegenüber der Gruppe B niedriger.

Unabhängig von dieser Fragestellung sollte ein Test etabliert werden, der die Quantifizierung von SIVagm-RNA erlaubt. Bislang wurde die Plasmaviruslast durch Quantifizierung der Reverse Transkriptase bestimmt. Es gab keine Methode, die auf dem Nachweis viraler RNA beruht. Die bislang verwendete Methode war außerdem sehr störanfällig und sollte durch eine gut reproduzierbare ersetzt werden. Dazu wurde eine quantitative Taqman-RT-PCR etabliert, basierend auf Vervet-spezifischen Primern bzw. Sonde, die einen Nachweis von 100 RNA-Kopien erlaubt. Die erreichte Sensitivität entspricht den Erfordernissen und läßt einen Vergleich

mit der Virusbelastung anderer Spezies bzw. einen Vergleich mit der Plasmavirusbelastung HIV-infizierter Menschen zu.

Die gemessene Viruslast zwei Wochen nach SIVagm-Infektion lag mit Werten von 10^5 - 10^7 RNA Kopien pro ml Plasma deutlich über den zum Teil in der Literatur beschriebenen Werten. Werte dieser Größenordnung lassen nicht darauf schließen, daß eine auf ein niedriges Niveau regulierte Virusbelastung verantwortlich ist für den benignen Verlauf der Infektion im natürlichen Wirt. Die Virusbelastung fiel zwar nach der akuten Phase ab, aber selbst nach Einstellung auf ein Plateau konnten Werte von 10^3 - 10^6 RNA Kopien pro ml gemessen werden. Diese Werte blieben über einen Zeitraum von einem Jahr relativ stabil. Ein Unterschied war nicht zu erkennen.

Die entscheidenden Veränderungen während der HIV-Pathogenese finden in den Lymphknoten statt. Deshalb lag auch bei dieser Studie der Focus auf der Untersuchung der Lymphknoten. Das lymphoide System beherbergt 98% der Lymphozyten des Körpers und ist somit der wichtigste Ort der HIV-Infektion. Nach Bindung von Antikörpern an HIV kommt es an der Zelloberfläche von Follikulär Dendritischen Zellen in den germinalen Zentren der Lymphknoten zu einem Anheften dieser Immunkomplexe, sog. „Virus-Trapping“. Zusätzlich dazu findet sich HIV intrazellulär in $CD4^+$ -T-Lymphozyten. FDC existieren in nahezu allen sekundären Lymphgeweben. Normalerweise binden sie Antigene in Form von Immunkomplexen an der Zelloberfläche und erhalten diese für viele Monate in ihrer naiven Form. Burton und Montefiori, 1997) konnten zeigen, daß die HIV-Immunkomplexe auf den FDC, auch wenn sie nicht replikationsfähig sind, durchaus infektiös sind. Die germinalen Zentren der Lymphknoten sind der Ort der Rezirkulation $CD4^+$ -T-Zellen, und zeitgleich findet hier eine Exposition $CD4^+$ -Zellen mit infektiösem Virus statt (Heath *et al.*, 1995; Tenner-Racz und Racz, 1995). Die Bindung von Viruspartikeln an der Oberfläche von FDC ist für die Vermehrung des HI-Virus sehr gewinnbringend. Hier werden aktivierte suszeptible Zielzellen und infektiöses Virus zusammengebracht. Möglicherweise kommt es aufgrund der Bindung von HIV-Immunkomplexen auf FDC zu einer folliculären Hyperplasie und nachfolgend zur Apoptose und Lyse der Keimzentren.

Bislang ist ungeklärt, welche Antikörper für die Bindung von HIV auf FDC verantwortlich sind. Da es im Verlauf der SIVagm-Infektion in AGM nicht zu einem Virus-Trapping auf FDC kommt und die Bildung von Antikörpern gegen das Kernprotein ausbleibt, sollte untersucht werden, ob

die Existenz von Gag-Antikörpern in der Lage ist, dies herbeizuführen bzw. ob es dadurch zu einem Anstieg der Viruslast in den Lymphknoten kommt.

Vier Wochen nach Infektion der Tiere mit SIVagm wurden Lymphknoten entnommen und bei makroskopischer Betrachtung zeigte sich, daß die Vergrößerung der Organe bei Gruppe A, der Gag-immunisierten Gruppe, deutlich stärker war, als bei Kontrollgruppen B und C. Im Bereich der Lymphknotenrinde wurden zwar bei allen Tieren der Gruppe A und B germinale Zentren gefunden, jedoch war die beobachtete Hyperplasie der Keimzentren bei Gruppe A deutlich ausgeprägter als bei Gruppe B. Die Struktur der germinalen Zentren war vier Wochen nach Infektion intakt, d.h. die Keimzentren waren rund und konturiert und zeigten keine Lyse. Keimzentren wurden zwar auch in zwei Tieren der Gruppe C, der nicht-SIVagm-infizierten Kontrollgruppe, gefunden, allerdings deutlich kleiner. Welche Infektion diese Tiere zum Zeitpunkt der Lymphknotenentnahme durchgemacht haben ist unklar.

Immunhistochemisch sollte das Ausmaß der Viruslast in den Lymphknoten bestimmt werden. Eingesetzt wurde dafür ein polyklonales Kaninchenantiserum gegen Gag-Protein. Die Anzahl der infizierten Zellen, insbesondere im Bereich der Sekundärfollikel, war bei Gruppe A deutlich höher als bei Gruppe B. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, daß die Existenz von Gag-Antikörpern die Infektion von CD4⁺-T-Zellen in den Lymphknoten begünstigt und somit eine Erhöhung der Viruslast im lymphatischen Gewebe herbeiführt. Zwar konnten auch SIVagm-positive Zellen in der Gruppe B detektiert werden, jedoch deutlich weniger. Dies gilt für alle untersuchten Tiere. Technisch problematisch war der Einsatz des polyklonalen Antiserums. Wie zu erwarten war die Spezifität hier deutlich schlechter als bei Einsatz eines monoklonalen Antikörpers. So wurden z.T. auch in nicht SIVagm-infizierten Kontrolltieren angefärbte Zellen gefunden, und diese Methode läßt eine eindeutige Diskriminierung von positiven und negativen Tieren nicht zu.

Zum Nachweis des Virus-Trappings wurde eine nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH) durchgeführt. Dabei kommt es durch Hybridisierung einer DIG-markierten antisense-RNA-Sonde zum Nachweis viraler RNA. Prinzipiell sollte es mit dieser Methode möglich sein, intrazellulär vorliegende RNA von extrazellulär gebundener RNA zu unterscheiden. Erstere führt zu einer deutlich stärkeren Anfärbung und die Zelle stellt sich scharf konturiert dar, wohingegen die zweite zu einer diffusen, deutlich helleren und auf die germinalen Zentren beschränkten Anfärbung führt.

Bei allen Tiere der Gruppe A konnte im Bereich der Rinde, insbesondere im Bereich der Keimzentren, virale RNA gefunden werden. Dies stimmt mit den immunhistochemischen Daten überein und auch hier war die Menge der angefärbten Zellen bei Gruppe A deutlich stärker als bei Gruppe B. Bei beiden Gruppen läßt die Art der Färbung darauf schließen, daß es sich um den Nachweis intrazellulär vorliegender RNA handelt. Im Vergleich dazu konnten bei Gruppe C, der Negativ-Kontrollgruppe, keine in Keimzentren lokalisierte, positive Zellen gefunden werden. Die Spezifität der ISH genügt den Erfordernissen und läßt eine Diskriminierung zu.

Zusätzlich konnte bei zwei Tieren der Gruppe A (AGM 212 und 97) eine diffuse Färbung des gesamten Follikels beobachtet werden. Prinzipiell würde diese „wolkige“ Anfärbung der germinalen Zentren für das Vorliegen von extrazellulär gebundenem Virus sprechen. Die Beurteilung fällt aber sehr schwer, da zum Vergleich herangezogene Publikationen meist auf dem Einsatz radioaktiv-markierter RNA-Sonden beruhen und somit ein anderes Nachweissystem darstellen. Ausserdem konnten diese Ergebnisse nur für zwei der insgesamt vier Gag-immunisierten Tiere gezeigt werden. Zumindest aber wurden ähnliche Beobachtungen in Gruppe B nicht gemacht und dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, daß die Existenz der Gag-Antikörper eine Bildung von Immunkomplexen und nachfolgend eine Bindung dieser an der Oberfläche von FDC mit sich bringt. Die ein Jahr nach erfolgter Infektion entnommenen Lymphknoten lassen keine diffuse Färbung mehr erkennen. Eventuell waren die Gag-Antikörpertiter zum Zeitpunkt der zweiten Lymphknotenentnahme nicht mehr ausreichend hoch. Dies wiederum hätte dazu geführt, daß keine Immunkomplexe gebildet worden wären und somit auch kein Virus-Trapping hätte stattfinden können.

Bislang wurden in keinem apathogenen SIV/Primatensystem Anzeichen von Virus-Trapping gefunden. In SIVsm-infizierten Sooty mangabeys wurden zwar germinale Zentren gefunden, jedoch zeigten diese eine normale Größe und Form. Eine folliculäre Hyperplasie konnte nicht detektiert werden. Mittels ISH wurden zwar infizierte Zellen nachgewiesen, diese hauptsächlich in der T-Zellzone der Rinde, aber die, für die extrazelluläre Anwesenheit von Viruspartikeln auf FDC, typische diffuse Färbung konnte in keinem der untersuchten Tiere gezeigt werden (Rey-Cuille *et al.*, 1998). Die Untersuchung von Lymphknoten von HIV-1-infizierten Schimpansen zeigte keine Anzeichen von Virus-Trapping. Ähnlich wie im Menschen verläuft die HIV-1-Infektion von Schimpansen aktiv und persistierend. Im Gegensatz zum Menschen zeigen Schimpansen allerdings eine relative Resistenz gegen AIDS. Chronisch infizierte

asymptomatische Tiere zeigen fast keine Anwesenheit von Virus in den germinalen Zentren, und es können fast keine produktiv infizierten Zellen gefunden werden. Die Architektur der Lymphknoten bleibt intakt und es gibt keine Hinweise auf die Existenz von Viruspartikeln auf der Zelloberfläche von FDC. Gag-spezifische Antikörper konnten detektiert werden und vieles spricht dafür, daß die niedrige Plasmavirusbelastung verantwortlich ist für das Fehlen von Viruspartikeln auf der Oberfläche von FDC und das Ausbleiben einer Krankheitsprogression.

Die meisten HIV-1-Infizierten zeigen innerhalb der ersten zehn Jahre nach Serokonversion Symptome einer Immundefizienz. Einige, sogenannte Langzeitinfizierte, bleiben jedoch für z.T. mehr als zehn Jahre klinisch gesund und zeigen einen normalen Immunstatus. Die Proviruslast und die Plasmavirämie ist hier etwa zehnfach niedriger als bei HIV-Infizierten mit Krankheitsprogression. Die Untersuchungen der Lymphknoten zeigten drei unterschiedliche histopathologische Muster innerhalb der Langzeitinfizierten (Pantaleo *et al.*, 1995). Eine Gruppe zeigte kleine runde Follikel und keine Anzeichen einer follikulären Lyse. Eine zweite Gruppe zeigte Keimzentren mittlerer Größe, gelegentlich auch große irreguläre mit Anzeichen von Lyse. Die dritte Gruppe stellte ein Gemisch der ersten beiden dar. Die Anwesenheit von Virus war streng gebunden an die Anwesenheit von Keimzentren. In keinem Lymphknoten konnte Virus detektiert werden, wenn diese nicht oder nur sehr vereinzelt anwesend waren. Prinzipiell war die Lymphknotenaktivierung, d.h. die Formation von FDC zu Keimzentren in Langzeitinfizierten signifikant niedriger als in HIV-infizierten mit Krankheitsprogression. Der Grad des Virus-Trappings korrelierte direkt mit der Formierung von Keimzentren. Ob dies an der per se niedrigeren Viruslast liegt oder ob die niedrigere Rate an Gewebeaktivierung dafür verantwortlich ist, ist bislang unklar.

Es ist davon auszugehen, daß der Schutz vor Krankheitsprogression bei HIV-Langzeitinfizierten und SIVagm-infizierten AGM unterschiedliche Ursachen hat. Im ersten Fall ist die Plasmavirusbelastung niedrig und die Virusbelastung der Lymphknoten zeigt ein heterogenes Muster. Abhängig von der Existenz hyperplastischer Follikel kann Virus-Trapping gefunden werden. Im Gegensatz dazu ist die Viruslast im SIVagm/AGM-System deutlich höher, und es finden sich keine Viruspartikel auf der Oberfläche von FDC.

In humanem Plasma aktiviert HIV das Komplement-System auch unter Abwesenheit spezifischer Antikörper. Es kommt allerdings aufgrund von Komplement-regulierenden Molekülen, welche HIV während des „buddings“ in die Virushülle einbaut oder welche nachfolgend an das HIV

Envelope-Glykoprotein gebunden werden, nicht zur effizienten Virolyse. Durch Interaktionen des Virus mit Komplementkomponenten, d.h. durch Opsonisierung des Virus, kommt es zu einer verstärkten Infektiösität, zur Lokalisierung des Virus in den Follikeln der Lymphknoten und zu einer Erweiterung des Zielzellangebots (Stoiber *et al.*, 1997). Nach Übergang von der akuten in die chronische Phase der HIV-Infektion vermitteln gebundene Komplementfragmente, insbesondere C3d, eine Langzeit-Lagerung von Virionen in den Keimzentren des Lymphgewebes. CR2 (CD21) konnte als wichtigste Bindungsstelle von opsonisiertem HIV in Keimzentren identifiziert werden (Kacani *et al.*, 2000).

Ausgehend davon, daß SIVagm *in vivo* nicht opsoniert, d.h. beladen mit Komplementfragmenten vorliegt und demzufolge eine Anheftung via Komplement-Rezeptor auf FDC nicht möglich wäre, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit getestet werden, ob das Virus *in vitro* von unterschiedlichen Primaten-Spezies unterschiedlich opsoniert wird. Dazu wurde Plasma von M. Nemestrina, Pavian, Rhesusaffen und AGM mit SIVagm inkubiert und nachfolgend unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen C3d und C3e im Antigen-capture-assay nach dem Opsonierungsgrad des Virus geschaut. Es konnten keine Unterschiede festgemacht werden. Dies schließt allerdings nicht aus, daß Gag-Partikel, im Gegensatz zu Gesamtvirus, *in vivo* nicht opsoniert werden.

Lange wurde die Apathogenität SIVagm-infizierter AGM damit erklärt, daß die Höhe der Virusbelastung den kritischen Punkt nicht überschreitet und somit der Krankheitsausbruch ausbleibt. Im Rahmen der Gag-Studie konnte deutlich gezeigt werden, daß die Virusbelastung im natürlichen Wirt von SIVagm nicht niedriger ist als diejenige, HIV-infizierter Menschen bzw. SIVmac-infizierter Rhesusaffen.

Die Plasmavirusbelastung HIV-infizierter Menschen, die keine antiretrovirale Therapie bekommen, variiert enorm. In einer der ersten Studien wurden Virusbelastungen in einem Bereich von 1×10^2 - $2,2 \times 10^7$ RNA Kopien/ml gemessen (Piatak *et al.*, 1993). Andere Studien zeigten Kopienzahlen von weniger als 10^2 bis $2,9 \times 10^5$ /ml (Mellors *et al.*, 1996), $2,3 \times 10^2$ /ml bis $7,6 \times 10^5$ /ml (Bagnarelli *et al.*, 1992), weniger als 5×10^2 bis $4,8 \times 10^6$ /ml (Lewin *et al.*, 1999) und 3×10^4 bis $1,1 \times 10^6$ /ml (Ho *et al.*, 1995). All das läßt nicht erkennen, daß die Virusreplikation im natürlichen Wirt immunkontrolliert abläuft.

Dies gilt ebenso für die SIVsm-Infektion in Sooty mangabeys. Auch in diesem apathogenen SIV/Primaten System wurden Werte dieser Größenordnung gemessen (Rey-Cuille *et al.*, 1998).

Besonders interessant war in diesem Kontext die während der HIV-Infektion gezeigte Korrelation zwischen Virusbelastung und Beginn der Krankheitsprogression. Viele Studien konnten zeigen, daß konstante Werte von durchschnittlich 10^5 RNA Kopien pro ml direkt assoziiert sind mit dem Beginn von AIDS. Hingegen sind HIV-Infizierte mit niedriger Virusbelastung über Jahre symptomfrei (Mellors *et al.*, 1996; Romeu *et al.*, 1999).

Um sicher zu gehen, daß die gemessene Plasmaviruslast nicht auf die experimentelle Infektion zurückzuführen ist, wurde parallel die RNA-Kopienzahl in natürlich infizierten AGM gemessen. Die Werte waren vergleichbar.

Mehr als die Hälfte der untersuchten AGM, sowohl natürlich als auch experimentell infiziert, zeigten eine Virusbelastung von mehr als 10^5 RNA Kopien/ml, 13 der insgesamt 34 untersuchten Tiere sogar mehr als 10^6 RNA Kopien/ml. Viele AGM tolerieren also Virusbelastungen deren Höhe im Menschen schnell zu einer Entwicklung von AIDS führen würden. Sogar Patienten mit AIDS und CD4+ T-Zellen unter 60 Zellen pro mm^3 hatten Durchschnittswerte von $2,4 \times 10^6$ /ml (Piatak *et al.*, 1993). Verglichen mit der SIVagm-Infektion der AGM ist die Virämie SIVmac-infizierter Rhesusaffen, die zu den sogenannten „Rapid Progressor“ gehören, relativ hoch. In einer Studie (Staprans *et al.*, 1999) konnten in der akuten Phase Werte von $1,9 \times 10^9$ Kopien/ml gemessen werden. Tiere, die diese hohe Virämie entwickelten, zeigten den sogenannten „crash and burn“ Phänotyp der schnellen Krankheitsprogression, oftmals assoziiert mit dem Ausbleiben der Serokonversion und dem Tod innerhalb von 1-5 Monaten (Norley, Manuskript in Arbeit). Generell kam es bei Tieren mit Viruslasten von 10^5 bis 10^7 langsamer zu einer Krankheitsprogression, d.h. innerhalb von 6 Monaten bis zu 3 Jahren. Retrospektiv betrachtete Studien (Ten Haaft *et al.*, 1998) konnten zeigen, daß kontinuierliche Viruslasten über dem „Schwellenwert“ von 10^5 Kopien/ml im suszeptiblen Wirt zu AIDS führen, unabhängig von der Virusspezies. AGM jedoch zeigten in diesem Experiment Werte, die deutlich über diesem „Schwellenwert“ lagen. Zeitgleich wurden in dieser Studie die integrierten Provirus Kopien pro Millionen PBMC gemessen. Das Muster der Provirusbelastung war dem der Plasmaviruslast ähnlich. Obwohl eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern bestand, gab es doch erhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Tieren. Während die Plasmavirusbelastung von AGM 154 nur 3,5 fach höher war als die Provirusbelastung zeigte AGM 162 eine 7000fach höhere Plasmaviruslast. Daten von Bagnarelli *et al.* (1992) zeigten bei HIV-1-infizierten Menschen ähnlich unterschiedliche Plasmaviruslast-Proviruslast-Ratios, die von Faktor 4 bis 19000

reichten. Die experimentell infizierten AGM der Gag-Studie zeigten, daß die Provirusbelastung nach initialem Maximum relativ stabil bleibt, bei Werten von 73 bis 813 Provirus Kopien/ 10^6 PBMC. Diese Daten stimmen mit vorangegangenen Studien überein (Beer *et al.*, 1996; Hartung *et al.*, 1992) und sind vergleichbar mit den für HIV-1 infizierte Menschen beschriebenen Werte. Interessant ist, daß die drei natürlich SIVsm-infizierten Sooty mangabeys, also einem apathogenen SIV/Primaten System, mit 2450 bis 6020 DNA Kopien/ 10^6 PBMC deutlich höhere Werte zeigten (Rey-Cuille *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zum Verlauf der Plasma- bzw. Proviruslast, die einen sogenannten „set-point“ erkennen lassen, schwankt die Zahl der produktiv infizierten Zellen im Verlauf der Infektion stark. Die Werte fallen dabei zum Teil unter die Nachweisgrenze und steigen dann wieder an. Dabei gibt es auch bei einem zehnfachen Anstieg keine Korrelation mit der Plasma- oder Provirusbelastung. Möglicherweise ist dies ein Indikator dafür, daß die Aktivierung latent infizierter Zellen schneller ansteigt als die Virusbelastung per se. Es ist schwer, diese Werte mit publizierten Daten HIV-1-infizierter Menschen zu vergleichen, da die Kultivierungsbedingungen, der Virus-Zelltropismus, die Zelllinien und die Nachweismethoden zu unterschiedlich sind. Die mit dem gleichen Nachweissystem bestimmten produktiv infizierten PBMC in Rhesusaffen lagen in der akuten Phase zwischen 186 und $4008/10^6$ PBMC. Anschließend folgten Schwankungen, ähnlich wie sie bei AGM gesehen wurden (Norley, persönliche Mitteilung).

Im gleichen Zeitraum der Gag-Studie publizierte Diop *et al.*, (2000) die systemische und lymphoide Virusbelastung einer kleinen Gruppen SIVagm-infizierter Sabeus-AGM. Auch in dieser AGM-Subspezies konnten in der akuten Phase Werte von 2×10^6 bis 2×10^8 mit einem nachfolgenden Plateau von 2×10^3 bis 2×10^5 RNA Kopien pro ml detektiert werden. Der Autor interpretiert den Abfall um 1-3 Logstufen als kontrollierte Immunantwort, die in der Lage ist, durch effizient kontrollierte Virusreplikation die Krankheitsentstehung zu verhindern. Eine weitere Studie (Goldstein *et al.*, 2000) konnte für natürlich infizierte AGM (Vervet) sehr unterschiedlich hohe Plasmaviruslasten messen. Wobei die Werte zwischen 1×10^3 - 8×10^5 Kopien pro ml Plasma in der chronischen Phase lagen.

Obwohl der Abfall der Virusbelastung nach initialem Maximum offensichtlich auf einer antiviralen Immunantwort beruht, so ist doch nicht davon auszugehen, daß diese Antwort in AGM effektiver abläuft als im pathogenen SIV-System. Richtigerweise stellt der Autor fest, daß das initiale Maximum zeigt, daß AGM weder eine intrinsische noch genetische Resistenz gegen

die Virusreplikation besitzen können. Weiterhin weisen die in Lymphknoten deutlich niedrigeren Werte darauf hin, daß es eher einen lokal beschränkten Kontrollmechanismus der Replikation gibt als einen systemisch wirkenden. Möglicherweise ist dieser effizienter als bei Krankheits-suszeptiblen Primatenspezies. Möglich ist aber auch, daß hier nicht ein Virus-Kontrollmechanismus zum tragen kommt, sondern, im Gegensatz zu AIDS-suszeptiblen Systemen, keine Hyperaktivierung des Immunsystems stattfindet und deshalb eine Krankheitsprogression ausbleibt.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die Plasma- und zellassozierte Virusbelastung in experimentell und natürlich infizierten AGM ähnlich ist wie die HIV-1-infizierter Menschen. Verglichen mit SIVmac-infizierten Rhesusaffen, die eine schnelle Krankheitsprogression zeigen, liegen die Werte zwar niedriger, sind aber durchaus vergleichbar mit den Daten, die man bei Rhesusaffen findet, die eine typische AIDS-Progression erfahren. Genauso wie SIVsm-infizierte Sooty mangabeys tolerieren SIVagm-infizierte AGM eine hohe Virämie, die im heterologen Wirt SAIDS induzieren würde. Diese Daten machen deutlich, daß nicht eine systemische Suppression der Virusreplikation verantwortlich ist für den benignen Verlauf der SIVagm-Infektion im natürlichen Wirt.

Weiterhin ist festzustellen, daß die Verläufe der Plasma- und Proviruslast bzw. die zellassozierte Virusbelastung keine Änderung erfahren durch die Existenz von Gag-Antikörpern. Selbst wenn es nach Induktion der humoralen Immunantwort gegen das Kernprotein zu einem Virus-Trapping in den Lymphknoten kommt, so ist es doch mit Sicherheit nicht so effizient, daß es Einfluß nehmen könnte auf die periphere Viruslast. Die Menge der Viruspartikel wird in Gruppe A nicht minimiert.

Es ist noch immer unklar, warum der natürliche Wirt von SIVagm trotz Infektion zeitlebens nicht erkrankt.

Obwohl das Verständnis der Pathogenese von AIDS nach wie vor lückenhaft ist, so konnten doch insbesondere in den letzten fünf Jahren wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. So gibt es heute deutliche Hinweise darauf, daß der graduelle Verlust von CD4⁺-T-Zellen nicht auf eine Erschöpfung der Hämatopoese durch den gesteigerten T-Zell Umsatz zurückzuführen ist, sondern auf eine Hyperaktivierung des Immunsystems (Hazenberg *et al.*, 2000a). HIV-1 aktiviert das Immunsystem dauerhaft durch hohe und kontinuierliche Virion-Produktion und möglicherweise durch virale Genprodukte wie Nef (Swingler *et al.*, 1999). Sichtbar wird dies durch die

gesteigerte Expression verschiedener Leukozyten-Aktivierungsmarker, die Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer gesteigerten Lymphozytenproliferation und Apoptose (Hazenberg *et al.*, 2000a; Meyaard *et al.*, 1992). Die Bedeutung dieser persistierenden Aktivierung des Immunsystems während der HIV-1-Infektion wird deutlich, durch die Beobachtung, daß die Krankheitsprogression mit der Immunaktivierung assoziiert ist (Simmonds *et al.*, 1991) und die Expression von Aktivierungsmarkern auf CD8⁺-T-Zellen einen stärkeren prognostischen Marker darstellten, als die Virusbelastung oder die CD4⁺-T-Zellzahl (Giorgi *et al.*, 1999). Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß für SIVsm-infizierten Sooty mangabeys, einem apathogenen SIV/Primatensystem, eine normale T-Zell-Teilungsrate gefunden wurde und im Gegensatz dazu für SIVmac-infizierte Rhesusaffen eine persistierende Aktivierung des Immunsystems gefunden wurde (Chakrabarti *et al.*, 2000).

Aus diesem Grunde ist in naher Zukunft ein Projekt geplant, den Aktivierungsstatus des Immunsystems der AGM genauer zu untersuchen. Möglicherweise kommt es hier aufgrund einer genetischen Prädisposition, eventuell in Zusammenhang mit einem speziellen HLA-Typ, nicht zu einer immunologischen Hyperaktivierung und demzufolge auch nicht zu einem graduellen Verlust der CD4⁺-T-Zellen.

Es wird deutlich, daß es sich bei der HIV-Pathogenese um ein multifaktorielles und komplexes Geschehen handelt, so daß bei der Erforschung des apathogenen Verlaufs der SIV-Infektion in seinem natürlichen Wirt viele Aspekte in Betracht gezogen werden müssen.

5. Zusammenfassung

Bislang ist unklar, warum Afrikanische Grüne Meerkatzen (AGM, *Chlorocebus*), die in ihrem natürlichen Habitat bis zu 50% mit SIV_{agm} infiziert sind, zeitlebens keine Symptome einer Immundefizienz zeigen, d.h. eine Resistenz gegen AIDS-ähnliche Symptome besitzen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde in einer Studie die Immunantwort SIV_{agm}-infizierter AGM nach Immunstimulation mittels Tetanustoxoid untersucht. Ziel dieses Projekts war die Klärung der Frage, ob die Virusreplikation durch Stimulation des Immunsystems und damit einhergehend einer Vermehrung der Zielzellen von SIV, eine Änderung erfährt oder ob diese durch immunologische Kontrollmechanismen konstant bleibt.

Untersucht wurde dazu eine Gruppe von vier natürlich SIV_{agm}-infizierten AGM, die zwei Jahre nach Basisimmunisierung mit Tetanustoxoid im Abstand von vier Wochen i.m. immunisiert wurden. Der Zeitpunkt der SIV-Infektion lag vor der Basisimmunisierung. Wöchentlich fanden Blutentnahmen statt und es wurden immunologische und virologische Parameter bestimmt. Die gemessenen Lymphozytenwerte, die FACS-Daten und die Lymphozytenproliferationskapazität ließen nach Tetanustoxoidgabe keine Änderung erkennen. Die Daten gaben keinen Hinweis darauf, daß die exogene Antigen-spezifische Stimulation zu einer Proliferation der Gedächtniszellen geführt hätte. Es ist davon auszugehen, daß es während der Basisimmunisierung zu einer Proliferation von CD4⁺-T-Zellen kam und diese nachfolgend infiziert bzw. eliminiert wurden. Somit waren keine Tetanus-spezifischen Gedächtniszellen zum Zeitpunkt der Immunstimulation mehr existent. Um dieses Problem auszuschließen, müssten SIV_{agm}-negative AGM eine Basisimmunisierung erhalten und erst anschließend dürfte eine Infektion mit SIV_{agm} stattfinden. Aufgrund des Versuchsaufbaus kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Immunstimulation auf die Höhe der Virusbelastung Einfluß nimmt.

Für das apathogene SIV/Primatensystem konnte im Vergleich mit AIDS-suszeptiblen SIV/Primate-Systemen zwar keine deutlich stärkere humorale oder zelluläre Immunantwort gefunden werden, jedoch gibt es signifikante Unterschiede. AGM zeigen nur eine geringe Virusbelastung in den Lymphknoten und es konnte bislang in keinem natürlichen Wirt von SIV sog. „Virus-Trapping“, daß heißt die Anheftung von Viruspartikeln auf der Oberfläche von Fokkular Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Es wurde auch nie, trotz chronischer Infektion, eine Strukturänderung des lymphatischen Gewebes gefunden. Ein weiterer kurioser

Unterschied ist das Fehlen einer Immunantwort gegen natives Gag-Protein, obwohl es zu einer starken Immunantwort gegen das Env-Protein kommt.

In der zweiten durchgeführten Studie im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte, unter der Annahme, daß die obengenannten Phänomene miteinander assoziiert sind, folgende Hypothese untersucht werden:

Aufgrund des Fehlens der Gag-Antikörper kommt es bei AGM nicht wie bei einer HIV-Infektion zur Bildung von Immunkomplexen. Dementsprechend können keine Viruspartikel via Fc-Rezeptor auf FDC gebunden werden. Nachfolgend findet deshalb auch keine verstärkte Apoptose der FDC bzw. Lyse der germinalen Zentren statt, und die Lymphknotenarchitektur bzw.-struktur bleibt intakt.

Zunächst sollte deshalb im folgenden Projekt eine humorale Immunantwort gegen das Kernprotein von SIV induziert werden. Nach mehrfacher Immunisierung mit affinitätschromatographisch gereinigtem Gag-Protein entwickelten alle untersuchten Tiere (Gruppe A) hohe Antikörper-Titer. Nachfolgend wurden die Gag-immunisierte Gruppe und eine Kontrollgruppe (Gruppe B) experimentell infiziert. Die Negativkontrollgruppe (Gruppe C) blieb unbehandelt. In regelmäßigen Abständen erfolgten Blut- bzw. Lymphknotenentnahmen. Ein wichtiger Teil dieses Projekts war die Etablierung einer quantitativen RT-PCR zum Nachweis von SIVagm-RNA. Bislang war es nicht möglich, die virale RNA zu quantifizieren und bei der chronischen, benignen SIVagm-Infektion von AGM lag lange der Verdacht nahe, daß es aufgrund einer niedrigen Viruslast nicht zum Krankheitsausbruch kommt. Es konnte eine quantitative Taqman-RT-PCR etabliert werden, mit der der spezifische Nachweis mit einer Sensitivität von 100 RNA-Kopien pro ml möglich ist. Die Tiere zeigten Plasma- und Proviruslasten in einer Höhe, die durchaus vergleichbar ist mit der Viruslast HIV-infizierter Menschen bzw. SIVmac-infizierter Rhesusaffen. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß eine niedrige Viruslast der Grund für die Apathogenität ist.

Die Viruslast in den Lymphknoten wurde immunhistochemisch untersucht. Die zuvor Gag-immunisierten Tiere zeigten mehr infizierte Zellen, insbesondere im Bereich der Follikel, als Gruppe B. Diese Daten stimmten mit den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung überein. Auch hier konnte mehr virale RNA in den Follikeln der Gruppe A detektiert werden. Zwei der Tiere zeigten Anzeichen von Virus-Trapping in den Keimzentren der Lymphknoten. Die histologischen

Daten könnten darauf schließen lassen, daß die Existenz von Gag-Antikörpern auf die Viruslast in lymphatischem Gewebe Einfluß nimmt.

6. Literaturverzeichnis

- Aboulker, J.P. and Swart, A.M. (1993). Preliminary analysis of the Concorde trial. Concorde Coordinating Committee. *Lancet*. **341**: 889-890.
- Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nystrom, G. and Fenyo, E.M. (1990). Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *Aids*. **4**: 107-112.
- Aldovini, A. and Young, R.A. (1991). Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature*. **351**: 479-482.
- Alkhatib, G., Berger, E.A., Murphy, P.M. and Pease, J.E. (1997). Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions. *J Biol Chem*. **272**: 20420-20426.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. and Berger, E.A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. **272**: 1955-1958.
- Allan, J.S., Short, M., Taylor, M.E., Su, S., Hirsch, V.M., Johnson, P.R., Shaw, G.M. and Hahn, B.H. (1991). Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J Virol*. **65**: 2816-2828.
- Arnold, G.F., Resnick, D.A., Li, Y., Zhang, A., Smith, A.D., Geisler, S.C., Jacobo-Molina, A., Lee, W., Webster, R.G. and Arnold, E. (1994). Design and construction of rhinovirus chimeras incorporating immunogens from polio, influenza, and human immunodeficiency viruses. *Virology*. **198**: 703-708.
- Baba, T.W., Jeong, Y.S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M.F. and Ruprecht, R.M. (1995). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*. **267**: 1820-1825.
- Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N. and Ruprecht, R.M. (1999). Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med*. **5**: 194-203.
- Bacchetti, P. and Moss, A.R. (1989). Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature*. **338**: 251-253.
- Bagnarelli, P., Menzo, S., Valenza, A., Manzin, A., Giacca, M., Ancarani, F., Scalise, G., Varaldo, P.E. and Clementi, M. (1992). Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. *J Virol*. **66**: 7328-7335.
- Baier, M., Dittmar, M.T., Cichutek, K. and Kurth, R. (1991). Development of vivo of genetic variability of simian immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 8126-8130.
- Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K. and Kurth, R. (1995). HIV suppression by interleukin-16. *Nature*. **378**: 563.

- Baier, M., Werner, A., Cichutek, K., Garber, C., Muller, C., Kraus, G., Ferdinand, F.J., Hartung, S., Papas, T.S. and Kurth, R. (1989). Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active in vitro and in vivo. *J Virol.* **63**: 5119-5123.
- Balachandran, N., Frame, B., Chernesky, M., Kraiselburd, E., Kouri, Y., Garcia, D., Lavery, C. and Rawls, W.E. (1982). Identification and typing of herpes simplex viruses with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* **16**: 205-208.
- Banapour, B., Sernatinger, J. and Levy, J.A. (1986). The AIDS-associated retrovirus is not sensitive to lysis or inactivation by human serum. *Virology.* **152**: 268-271.
- Baroni, C.D., Vitolo, D. and Uccini, S. (1990). Immunohistopathogenesis of persistent generalized lymphadenopathy in HIV-positive patients. *Ric Clin Lab.* **20**: 1-10.
- Barouch, D.H., Santra, S., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Fu, T.M., Wagner, W., Bilska, M., Craiu, A., Zheng, X.X., Krivulka, G.R., Beaudry, K., Lifton, M.A., Nickerson, C.E., Trigona, W.L., Punt, K., Freed, D.C., Guan, L., Dubey, S., Casimiro, D., Simon, A., Davies, M.E., Chastain, M., Strom, T.B., Gelman, R.S., Montefiori, D.C., Lewis, M.G., Emini, E.A., Shiver, J.W. and Letvin, N. (2000). Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science.* **290**: 486-492.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautquet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **220**: 868-871.
- Baskin, G.B., Martin, L.N., Murphey-Corb, M., Hu, F.S., Kuebler, D. and Davison, B. (1995). Distribution of SIV in lymph nodes of serially sacrificed rhesus monkeys. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **11**: 273-285.
- Beer, B., Denner, J., Brown, C.R., Norley, S., zur Megede, J., Coulibaly, C., Plesker, R., Holzammer, S., Baier, M., Hirsch, V.M. and Kurth, R. (1998). Simian immunodeficiency virus of African green monkeys is apathogenic in the newborn natural host. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **18**: 210-220.
- Beer, B., Scherer, J., zur Megede, J., Norley, S., Baier, M. and Kurth, R. (1996). Lack of dichotomy between virus load of peripheral blood and lymph nodes during long-term simian immunodeficiency virus infection of African green monkeys. *Virology.* **219**: 367-375.
- Bentwich, Z., Kalinkovich, A. and Weisman, Z. (1995). Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol Today.* **16**: 187-191.
- Berggren, R.E., Wunderlich, A., Ziegler, E., Schleicher, M., Duke, R.C., Looney, D. and Fang, F.C. (1995). HIV gp120-specific cell-mediated immune responses in mice after oral immunization with recombinant Salmonella. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **10**: 489-495.
- Blackbourn, D.J., Chuang, L.F., Killam, K.F., Jr. and Chuang, R.Y. (1994). Inhibition of simian immunodeficiency virus (SIV) replication by CD8⁺ cells of SIV-infected rhesus macaques: implications for immunopathogenesis. *J Med Primatol.* **23**: 343-354.

- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. and Oldstone, M.B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **68**: 6103-6110.
- Boyer, J.D., Ugen, K.E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W.V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R.B., McCallus, D., Coney, L. and Weiner, D.B. (1997). Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med.* **3**: 526-532.
- Boyer, J.D., Wang, B., Ugen, K.E., Agadjanyan, M., Javadian, A., Frost, P., Dang, K., Carrano, R.A., Ciccarelli, R., Coney, L., Williams, W.V. and Weiner, D.B. (1996). In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J Med Primatol.* **25**: 242-250.
- Braciale, T.J., Morrison, L.A., Sweetser, M.T., Sambrook, J., Gething, M.J. and Braciale, V.L. (1987). Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. *Immunol Rev.* **98**: 95-114.
- Brinchmann, J.E., Gaudernack, G. and Vartdal, F. (1990). CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J Immunol.* **144**: 2961-2966.
- Burton, D.R. and Montefiori, D.C. (1997). The antibody response in HIV-1 infection. *Aids.* **11**: S87-98.
- Cann, A.J. and Karn, J. (1989). Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *Aids.* **3**: S19-34.
- Carmichael, A., Jin, X., Sissons, P. and Borysiewicz, L. (1993). Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med.* **177**: 249-256.
- Chakrabarti, L.A., Lewin, S.R., Zhang, L., Gettie, A., Luckay, A., Martin, L.N., Skulsky, E., Ho, D.D., Cheng-Mayer, C. and Marx, P.A. (2000). Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection. *J Virol.* **74**: 1209-1223.
- Chen, Z., Telfier, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D.D. and Marx, P.A. (1996). Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol.* **70**: 3617-3627.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* **85**: 1135-1148.
- Clapham, P.R., Blanc, D. and Weiss, R.A. (1991). Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology.* **181**: 703-715.

- Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D., Campbell-Hill, S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J., Kappes, J.C., Hahn, B.H. and Shaw, G.M. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med.* **324**: 954-960.
- Claydon, E.J., Bennett, J., Gor, D. and Forster, S.M. (1991). Transient elevation of serum HIV antigen levels associated with intercurrent infection. *Aids.* **5**: 113-114.
- Clerici, M., Balotta, C., Trabattoni, D., Papagno, L., Ruzzante, S., Rusconi, S., Fusi, M.L., Colombo, M.C. and Galli, M. (1996). Chemokine production in HIV-seropositive long-term asymptomatic individuals. *Aids.* **10**: 1432-1433.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* **270**: 1811-1815.
- Colebunders, R.L. and Latif, A.S. (1991). Natural history and clinical presentation of HIV-1 infection in adults. *Aids.* **5**: S103-112.
- Coombs, R.W., Collier, A.C., Allain, J.P., Nikora, B., Leuther, M., Gjerset, G.F. and Corey, L. (1989). Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* **321**: 1626-1631.
- Cooper, D.A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T.G., Michelmore, H.M., Brooke, P. and Penny, R. (1985). Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet.* **1**: 537-540.
- Copeland, K.F., McKay, P.J. and Rosenthal, K.L. (1996). Suppression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is dependent on the NFAT-1 element. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **12**: 143-148.
- Corbet, S., Muller-Trutwin, M.C., Versmisse, P., Delarue, S., Ayoub, A., Lewis, J., Brunak, S., Martin, P., Brun-Vezinet, F., Simon, F., Barre-Sinoussi, F. and Maucere, P. (2000). env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol.* **74**: 529-534.
- Cox, W.I., Tartaglia, J. and Paoletti, E. (1993). Induction of cytotoxic T lymphocytes by recombinant canarypox (ALVAC) and attenuated vaccinia (NYVAC) viruses expressing the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology.* **195**: 845-850.
- D'Souza, M.P. and Harden, V.A. (1996). Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med.* **2**: 1293-1300.
- Dagleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* **312**: 763-767.
- Daniel, M.D., Li, Y., Naidu, Y.M., Durda, P.J., Schmidt, D.K., Troup, C.D., Silva, D.P., MacKey, J.J., Kestler, H.W.d., Sehgal, P.K. and et al. (1988). Simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J Virol.* **62**: 4123-4128.
- Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Kodama, T., Wyand, M.S., Ringler, D.J., King, N.W., Schmidt, D.K., Troup, C.D. and Desrosiers, R.C. (1990). Use of simian immunodeficiency virus for vaccine research. *J Med Primatol.* **19**: 395-399.

- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. **381**: 661-666.
- Desrosiers, R.C., Wyand, M.S., Kodama, T., Ringler, D.J., Arthur, L.O., Sehgal, P.K., Letvin, N.L., King, N.W. and Daniel, M.D. (1989). Vaccine protection against simian immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 6353-6357.
- Devito, C., Broliden, K., Kaul, R., Svensson, L., Johansen, K., Kiama, P., Kimani, J., Lopalco, L., Piconi, S., Bwayo, J.J., Plummer, F., Clerici, M. and Hinkula, J. (2000). Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol*. **165**: 5170-5176.
- Dewar, R.L., Natarajan, V., Vasudevachari, M.B. and Salzman, N.P. (1989). Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant human adenovirus. *J Virol*. **63**: 129-136.
- Dierich, M.P., Frank, I., Stoiber, H., Clivio, A., Spruth, M., Steindl, F. and Katinger, H.W. (1996). The envelope of HIV. *Immunol Lett*. **54**: 205-206.
- Diop, O.M., Gueye, A., Dias-Tavares, M., Kornfeld, C., Faye, A., Ave, P., Huerre, M., Corbet, S., Barre-Sinoussi, F. and Muller-Trutwin, M.C. (2000). High levels of viral replication during primary simian immunodeficiency virus SIVagm infection are rapidly and strongly controlled in African green monkeys. *J Virol*. **74**: 7538-7547.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G. and Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. **85**: 1149-1158.
- Doyle, C.B., Bhattacharyya, U., Kent, K.A., Stott, J.E. and Jones, I.M. (1995). Regions required for CD4 binding in the external glycoprotein gp120 of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. **69**: 1256-1260.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. and Paxton, W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature*. **381**: 667-673.
- Emau, P., McClure, H.M., Isahakia, M., Else, J.G. and Fultz, P.N. (1991). Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. **65**: 2135-2140.
- Embretson, J., Zupancic, M., Beneke, J., Till, M., Wolinsky, S., Ribas, J.L., Burke, A. and Haase, A.T. (1993). Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and in situ hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 357-361.
- Ennen, J., Findelee, H., Dittmar, M.T., Norley, S., Ernst, M. and Kurth, R. (1994a). CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**: 7207-7211.

- Ennen, J., Norley, S. and Kurth, R. (1994b). The activated CD8 T-lymphocyte-derived immunodeficiency-virus- suppressing lymphokine in African green monkeys: evidence for a role in control of infection? *Res Immunol.* **145**: 647-652; discussion 652-643.
- Ennen, J., Norley, S.G. and Kurth, R. (1992). AIDS vaccine: present problems and future perspectives. *Int J Clin Lab Res.* **22**: 206-210.
- Evans, D.J., McKeating, J., Meredith, J.M., Burke, K.L., Katrak, K., John, A., Ferguson, M., Minor, P.D., Weiss, R.A. and Almond, J.W. (1989). An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature.* **339**: 385-388, 340.
- Fauci, A.S. (1988). The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.* **239**: 617-622.
- Fauci, A.S. and Lane, H.C. (1984). Overview of clinical syndromes and immunology of AIDS. *Top Clin Nurs.* **6**: 12-18.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* **272**: 872-877.
- Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T. and et al. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* **317**: 185-191.
- Fomsgaard, A., Hirsch, V.M., Allan, J.S. and Johnson, P.R. (1991). A highly divergent proviral DNA clone of SIV from a distinct species of African green monkey. *Virology.* **182**: 397-402.
- Forthal, D.N., Landucci, G., Katz, J. and Tilles, J.G. (1993). Comparison of measles virus-specific antibodies with antibody-dependent cellular cytotoxicity and neutralizing functions. *J Infect Dis.* **168**: 1020-1023.
- Frank, H., Schwarz, H., Graf, T. and Schafer, W. (1978). Properties of mouse leukemia viruses. XV. Electron microscopic studies on the organization of Friend leukemia virus and other mammalian C-type viruses. *Z Naturforsch [C].* **33**: 124-138.
- Fuller, D.H., Murphey-Corb, M., Clements, J., Barnett, S. and Haynes, J.R. (1996). Induction of immunodeficiency virus-specific immune responses in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *J Med Primatol.* **25**: 236-241.
- Fultz, P.N., Gluckman, J.C., Muchmore, E. and Girard, M. (1992). Transient increases in numbers of infectious cells in an HIV-infected chimpanzee following immune stimulation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **8**: 313-317.
- Fultz, P.N., Stricker, R.B., McClure, H.M., Anderson, D.C., Switzer, W.M. and Horaist, C. (1990). Humoral response to SIV/SMM infection in macaque and mangabey monkeys. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **3**: 319-329.
- Fust, G., Dierich, M.P. and Hidvegi, T. (1995). Role of humoral factors in the progression of HIV disease. *Immunol Today.* **16**: 167-169.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M. and Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* **397**: 436-441.

- Gardner, M.B., Luciw, P.A., Sawai, E.T., Marthas, M.L., Miller, C.J., McChesney, M.B., Lerche, N.W. and Pedersen, N.C. (1996). Simian retrovirus vaccines: simian retrovirus and simian immunodeficiency lentivirus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **12**: 399-401.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D.M., Betts, R.F. and Popovic, M. (1986). Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *Jama*. **256**: 2365-2371.
- Gelderblom, H.R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids*. **5**: 617-637.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G. and Koch, M.A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*. **156**: 171-176.
- Gicheru, M.M., Otsyula, M., Spearman, P., Graham, B.S., Miller, C.J., Robinson, H.L., Haigwood, N.L. and Montefiori, D.C. (1999). Neutralizing antibody responses in Africa green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus (SIVagm). *J Med Primatol*. **28**: 97-104.
- Giorgi, J.V., Hultin, L.E., McKeating, J.A., Johnson, T.D., Owens, B., Jacobson, L.P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D.J., Phair, J.P., Wolinsky, S.M. and Detels, R. (1999). 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. *J Infect Dis*. **179**: 859-870.
- Girard, M., Kieny, M.P., Pinter, A., Barre-Sinoussi, F., Nara, P., Kolbe, H., Kusumi, K., Chaput, A., Reinhart, T., Muchmore, E. and et al. (1991). Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 542-546.
- Goldstein, S., Ourmanov, I., Brown, C.R., Beer, B.E., Elkins, W.R., Plishka, R., Buckler-White, A. and Hirsch, V.M. (2000). Wide range of viral load in healthy african green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J Virol*. **74**: 11744-11753.
- Gotch, F.M., Hovell, R., Delchambre, M., Silvera, P. and McMichael, A.J. (1991). Cytotoxic T-cell response to simian immunodeficiency virus by cynomolgus macaque monkeys immunized with recombinant vaccinia virus. *Aids*. **5**: 317-320.
- Gotch, F.M., Nixon, D.F., Alp, N., McMichael, A.J. and Borysiewicz, L.K. (1990). High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in HIV seropositive individuals. *Int Immunol*. **2**: 707-712.
- Graham, B.S., Belshe, R.B., Clements, M.L., Dolin, R., Corey, L., Wright, P.F., Gorse, G.J., Midthun, K., Keefer, M.C., Roberts, N.J., Jr. and et al. (1992). Vaccination of vaccinia-naive adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J Infect Dis*. **166**: 244-252.
- Graziosi, C. and Pantaleo, G. (1998). Analysis of virologic and immunologic events in HIV infection. *Pathobiology*. **66**: 123-127.

- Greenberg, M.L., Lacey, S.F., Chen, C.H., Bolognesi, D.P. and Weinhold, K.J. (1997). Noncytolytic CD8 T cell-mediated suppression of HIV replication. *Springer Semin Immunopathol.* **18**: 355-369.
- Greene, W.C. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* **324**: 308-317.
- Gruters, R.A., Terpstra, F.G., De Jong, R., Van Noesel, C.J., Van Lier, R.A. and Miedema, F. (1990). Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. *Eur J Immunol.* **20**: 1039-1044.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature.* **326**: 662-669.
- Hadida, F., Parrot, A., Kieny, M.P., Sadat-Sowti, B., Mayaud, C., Debre, P. and Autran, B. (1992). Carboxyl-terminal and central regions of human immunodeficiency virus-1 NEF recognized by cytotoxic T lymphocytes from lymphoid organs. An in vitro limiting dilution analysis. *J Clin Invest.* **89**: 53-60.
- Hartung, S., Boller, K., Cichutek, K., Norley, S.G. and Kurth, R. (1992). Quantitation of a lentivirus in its natural host: simian immunodeficiency virus in African green monkeys. *J Virol.* **66**: 2143-2149.
- Haseltine, W.A. (1991). Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J.* **5**: 2349-2360.
- Hazenberg, M., Hamann, D., Schuitemaker, H. and Miedema, F. (2000a). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *nature.* **1**: 285-289.
- Hazenberg, M., Hamann, D., Schuitemaker, H. and Miedema, F. (2000b). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nature Immunology.* **1**: 285-289.
- Heath, S.L., Tew, J.G., Szakal, A.K. and Burton, G.F. (1995). Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature.* **377**: 740-744.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 7311-7315.
- Hirsch, V.M., Dapolito, G., Johnson, P.R., Elkins, W.R., London, W.T., Montali, R.J., Goldstein, S. and Brown, C. (1995). Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J Virol.* **69**: 955-967.
- Hirsch, V.M., Fuerst, T.R., Sutter, G., Carroll, M.W., Yang, L.C., Goldstein, S., Piatak, M., Jr., Elkins, W.R., Alvord, W.G., Montefiori, D.C., Moss, B. and Lifson, J.D. (1996). Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J Virol.* **70**: 3741-3752.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H. and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature.* **339**: 389-392.

- Ho, D.D. (1992). HIV-1 viraemia and influenza. *Lancet*. **339**: 1549.
- Ho, D.D., Moudgil, T. and Alam, M. (1989). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med*. **321**: 1621-1625.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M. and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. **373**: 123-126.
- Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., Vilmer, E., Michel, F., Mayaud, C., Autran, B. and Plata, F. (1989). Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol*. **142**: 452-462.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 7276-7280.
- Hu, S.L., Abrams, K., Barber, G.N., Moran, P., Zarling, J.M., Langlois, A.J., Kuller, L., Morton, W.R. and Benveniste, R.E. (1992). Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science*. **255**: 456-459.
- Hu, S.L., Polacino, P., Stallard, V., Klaniecki, J., Pennathur, S., Travis, B.M., Misher, L., Kornas, H., Langlois, A.J., Morton, W.R. and Benveniste, R.E. (1996). Recombinant subunit vaccines as an approach to study correlates of protection against primate lentivirus infection. *Immunol Lett*. **51**: 115-119.
- Hu, S.L., Stallard, V., Abrams, K., Barber, G.N., Kuller, L., Langlois, A.J., Morton, W.R. and Benveniste, R.E. (1993). Protection of vaccinia-primed macaques against SIVmne infection by combination immunization with recombinant vaccinia virus and SIVmne gp160. *J Med Primatol*. **22**: 92-99.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. **345**: 356-359.
- Janossy, G., Pinching, A.J., Bofill, M., Weber, J., McLaughlin, J.E., Ornstein, M., Ivory, K., Harris, J.R., Favrot, M. and Macdonald-Burns, D.C. (1985). An immunohistological approach to persistent lymphadenopathy and its relevance to AIDS. *Clin Exp Immunol*. **59**: 257-266.
- Jassey, C., Johnson, R.P., Navia, B.A., Worth, J. and Walker, B.D. (1992). Detection of a vigorous HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in cerebrospinal fluid from infected persons with AIDS dementia complex. *J Immunol*. **149**: 3113-3119.
- Javaherian, K., Langlois, A.J., McDanal, C., Ross, K.L., Eckler, L.I., Jellis, C.L., Profy, A.T., Rusche, J.R., Bolognesi, D.P., Putney, S.D. and et al. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 6768-6772.
- Jin, M.J., Hui, H., Robertson, D.L., Muller, M.C., Barre-Sinoussi, F., Hirsch, V.M., Allan, J.S., Shaw, G.M., Sharp, P.M. and Hahn, B.H. (1994). Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from west African green monkeys. *Embo J*. **13**: 2935-2947.
- Johnson, P.R., Goldstein, S., London, W.T., Fomsgaard, A. and Hirsch, V.M. (1990). Molecular clones of SIVsm and SIVagm: experimental infection of macaques and African green monkeys. *J Med Primatol*. **19**: 279-286.

- June, R.A., Schade, S.Z., Bankowski, M.J., Kuhns, M., McNamara, A., Lint, T.F., Landay, A.L. and Spear, G.T. (1991). Complement and antibody mediate enhancement of HIV infection by increasing virus binding and provirus formation. *Aids*. **5**: 269-274.
- Kacani, L., Prodinger, W.M., Sprinzl, G.M., Schwendinger, M.G., Spruth, M., Stoiber, H., Dopfer, S., Steinhuber, S., Steindl, F. and Dierich, M.P. (2000). Detachment of human immunodeficiency virus type 1 from germinal centers by blocking complement receptor type 2. *J Virol*. **74**: 7997-8002.
- Kannagi, M., Chalifoux, L.V., Lord, C.I. and Letvin, N.L. (1988). Suppression of simian immunodeficiency virus replication in vitro by CD8+ lymphocytes. *J Immunol*. **140**: 2237-2242.
- Katzenstein, T.L., Pedersen, C. and Gerstoft, J. (1997). HIV quantification--how and why. *Ugeskr Laeger*. **160**: 18-24.
- Kent, S.J., Hu, S.L., Corey, L., Morton, W.R. and Greenberg, P.D. (1996). Detection of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD8+ T cells in macaques protected from SIV challenge by prior SIV subunit vaccination. *J Virol*. **70**: 4941-4947.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. **312**: 767-768.
- Klein, M.R., van Baalen, C.A., Holwerda, A.M., Kerkhof Garde, S.R., Bende, R.J., Keet, I.P., Eeftinck-Schattenkerk, J.K., Osterhaus, A.D., Schuitemaker, H. and Miedema, F. (1995). Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med*. **181**: 1365-1372.
- Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A. and Orenstein, J.M. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. **64**: 621-629.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. and Ho, D.D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. **68**: 4650-4655.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W.C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W. and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. **237**: 1351-1355.
- Koyanagi, Y., Miles, S., Mitsuyasu, R.T., Merrill, J.E., Vinters, H.V. and Chen, I.S. (1987). Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science*. **236**: 819-822.
- Kraus, G., Werner, A., Baier, M., Binniger, D., Ferdinand, F.J., Norley, S. and Kurth, R. (1989). Isolation of human immunodeficiency virus-related simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 2892-2896.
- Kurth, R., Kraus, G., Werner, A., Hartung, S., Centner, P., Baier, M., Norley, S. and Lower, J. (1988). AIDS: animal retrovirus models and vaccines. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **1**: 284-294.

- Lang, W., Perkins, H., Anderson, R.E., Royce, R., Jewell, N. and Winkelstein, W., Jr. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **2**: 63-69.
- Langlade-Demoyen, P., Ngo-Giang-Huong, N., Ferchal, F. and Oksenhendler, E. (1994). Human immunodeficiency virus (HIV) nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J Clin Invest.* **93**: 1293-1297.
- Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V. and King, N.W. (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science.* **230**: 71-73.
- Letvin, N.L., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Perry, H.C., Davies, M.E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D.C., Lord, C.I., Handt, L.K., Liu, M.A. and Shiver, J.W. (1997). Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 9378-9383.
- Levy, J.A. (1993). HIV pathogenesis and long-term survival. *Aids.* **7**: 1401-1410.
- Levy, J.A. (1996). The value of primate models for studying human immunodeficiency virus pathogenesis. *J Med Primatol.* **25**: 163-174.
- Lewin, S.R., Vesanen, M., Kostrikis, L., Hurley, A., Duran, M., Zhang, L., Ho, D.D. and Markowitz, M. (1999). Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J Virol.* **73**: 6099-6103.
- Ljunggren, K., Biberfeld, G., Jondal, M. and Fenyo, E.M. (1989). Antibody-dependent cellular cytotoxicity detects type- and strain- specific antigens among human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac isolates. *J Virol.* **63**: 3376-3381.
- Lu, M., Blacklow, S.C. and Kim, P.S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol.* **2**: 1075-1082.
- Lu, S., Arthos, J., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Manson, K., Mustafa, F., Johnson, E., Santoro, J.C., Wissink, J., Mullins, J.I., Haynes, J.R., Letvin, N.L., Wyand, M. and Robinson, H.L. (1996). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol.* **70**: 3978-3991.
- Luukkonen, B.G., Fenyo, E.M. and Schwartz, S. (1995). Overexpression of human immunodeficiency virus type 1 protease increases intracellular cleavage of Gag and reduces virus infectivity. *Virology.* **206**: 854-865.
- Lyerly, H.K., Matthews, T.J., Langlois, A.J., Bolognesi, D.P. and Weinhold, K.J. (1987). Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 4601-4605.
- Mackewicz, C. and Levy, J.A. (1992). CD8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **8**: 1039-1050.
- Mahalingam, S., Van Tine, B., Santiago, M.L., Gao, F., Shaw, G.M. and Hahn, B.H. (2001). Functional analysis of the simian immunodeficiency virus vpx protein: identification of packaging determinants and a novel nuclear targeting domain. *J Virol.* **75**: 362-374.

- Marschang, P., Kruger, U., Ochsenbauer, C., Gurtler, L., Hittmair, A., Bosch, V., Patsch, J.R. and Dierich, M.P. (1997). Complement activation by HIV-1-infected cells: the role of transmembrane glycoprotein gp41. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **14**: 102-109.
- Marschang, P., Sodroski, J., Wurzner, R. and Dierich, M.P. (1995). Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type 1 from inactivation by human complement. *Eur J Immunol.* **25**: 285-290.
- McCune, J.M., Rabin, L.B., Feinberg, M.B., Lieberman, M., Kosek, J.C., Reyes, G.R. and Weissman, I.L. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* **53**: 55-67.
- McKeating, J.A., Gow, J., Goudsmit, J., Pearl, L.H., Mulder, C. and Weiss, R.A. (1989). Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants. *Aids.* **3**: 777-784.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A. and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* **272**: 1167-1170.
- Meyaard, L., Otto, S.A., Jonker, R.R., Mijster, M.J., Keet, R.P. and Miedema, F. (1992). Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science.* **257**: 217-219.
- Mitchell, W.M., Torres, J., Johnson, P.R., Hirsch, V., Yilma, T., Gardner, M.B. and Robinson, W.E., Jr. (1995). Antibodies to the putative SIV infection-enhancing domain diminish beneficial effects of an SIV gp160 vaccine in rhesus macaques. *Aids.* **9**: 27-34.
- Montalero, R.C., Grund, C., Raabe, M., Woodson, B., Cook, R.F., Cook, S. and Issel, C.J. (1996). Characterization of protective and enhancing immune responses to equine infectious anemia virus resulting from experimental vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **12**: 413-415.
- Montefiori, D.C., Cornell, R.J., Zhou, J.Y., Zhou, J.T., Hirsch, V.M. and Johnson, P.R. (1994). Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology.* **205**: 82-92.
- Moore, J. and Ho, D. (1993). HIV tropism. *Nature.* **361**: 309-310.
- Moore, J.P. and Nara, P.L. (1991). The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *Aids.* **5**: S21-33.
- Morrow, C.D., Park, J. and Wakefield, J.K. (1994). Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol.* **266**: C1135-1156.
- Moss, P.A., Rowland-Jones, S.L., Frodsham, P.M., McAdam, S., Giangrande, P., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1995). Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 5773-5777.
- Murayama, Y., Amano, A., Mukai, R., Shibata, H., Matsunaga, S., Takahashi, H., Yoshikawa, Y., Hayami, M. and Noguchi, A. (1997). CD4 and CD8 expressions in African green monkey helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection. *Int Immunol.* **9**: 843-851.

- Murphey-Corb, M., Martin, L.N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R.C., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G.B., Zhang, J.Y., Putney, S.D. and et al. (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science*. **246**: 1293-1297.
- Myers, G., Korber, S., Wain-Hobson, S., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N. (1994). A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. *Human Retroviruses and AIDS*. **I-V**:
- Nabholz, M. and MacDonald, H.R. (1983). Cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. **1**: 273-306.
- Nara, P.L., Smit, L., Dunlop, N., Hatch, W., Merges, M., Waters, D., Kelliher, J., Gallo, R.C., Fischinger, P.J. and Goudsmit, J. (1990). Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees. *J Virol*. **64**: 3779-3791.
- Natuk, R.J., Chanda, P.K., Lubeck, M.D., Davis, A.R., Wilhelm, J., Hjorth, R., Wade, M.S., Bhat, B.M., Mizutani, S., Lee, S. and et al. (1992). Adenovirus-human immunodeficiency virus (HIV) envelope recombinant vaccines elicit high-titered HIV-neutralizing antibodies in the dog model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 7777-7781.
- Natuk, R.J., Lubeck, M.D., Chanda, P.K., Chengalvala, M., Wade, M.S., Murthy, S.C., Wilhelm, J., Vernon, S.K., Dheer, S.K., Mizutani, S. and et al. (1993). Immunogenicity of recombinant human adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **9**: 395-404.
- Norley, S., Beer, B., Holzammer, S., zur Megede, J. and Kurth, R. (1999). Why are the natural hosts of SIV resistant to AIDS? *Immunol Lett*. **66**: 47-52.
- Norley, S. and Kurth, R. (1992). Vaccination against HIV. *Immunobiology*. **184**: 193-207.
- Norley, S. and Kurth, R. (1997). Simian immunodeficiency virus as a model of HIV pathogenesis. *Springer Semin Immunopathol*. **18**: 391-405.
- Norley, S.G. (1996). SIVagm infection of its natural African green monkey host. *Immunol Lett*. **51**: 53-58.
- Norley, S.G., Kraus, G., Ennen, J., Bonilla, J., Konig, H. and Kurth, R. (1990a). Immunological studies of the basis for the apathogenicity of simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**: 9067-9071.
- Norley, S.G., Mikschy, U., Werner, A., Staszewski, S., Helm, E.B. and Kurth, R. (1990b). Demonstration of cross-reactive antibodies able to elicit lysis of both HIV-1- and HIV-2-infected cells. *J Immunol*. **145**: 1700-1705.
- Norley, S.G., Vogel, T. and Kurth, R. (1993). Anti-HIV vaccines. Current status and future developments. *Drugs*. **46**: 947-960.
- O'Brien, T.R., Blattner, W.A., Waters, D., Eyster, E., Hilgartner, M.W., Cohen, A.R., Luban, N., Hatzakis, A., Aledort, L.M., Rosenberg, P.S., Miley, W.J., Kroner, B.L. and Goedert, J.J. (1996). Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Jama*. **276**: 105-110.

- O'Brien, W.A., Grovit-Ferbas, K., Namazi, A., Ovcak-Derzic, S., Wang, H.J., Park, J., Yeramian, C., Mao, S.H. and Zack, J.A. (1995). Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood*. **86**: 1082-1089.
- Ohta, Y., Masuda, T., Tsujimoto, H., Ishikawa, K., Kodama, T., Morikawa, S., Nakai, M., Honjo, S. and Hayami, M. (1988). Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int J Cancer*. **41**: 115-122.
- Ostrowski, M.A., Stanley, S.K., Justement, J.S., Gantt, K., Goletti, D. and Fauci, A.S. (1997). Increased in vitro tetanus-induced production of HIV type 1 following in vivo immunization of HIV type 1-infected individuals with tetanus toxoid. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **13**: 473-480.
- Pachl, C., Todd, J.A., Kern, D.G., Sheridan, P.J., Fong, S.J., Stempien, M., Hoo, B., Besemer, D., Yeghiazarian, T., Irvine, B. and et al. (1995). Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. **8**: 446-454.
- Palker, T.J., Clark, M.E., Langlois, A.J., Matthews, T.J., Weinhold, K.J., Randall, R.R., Bolognesi, D.P. and Haynes, B.F. (1988). Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**: 1932-1936.
- Pantaleo, G., Cohen, O.J., Schacker, T., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Rizzardi, G.P., Kahn, J., Fox, C.H., Schnittman, S.M., Schwartz, D.H., Corey, L. and Fauci, A.S. (1998). Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med*. **4**: 341-345.
- Pantaleo, G. and Fauci, A.S. (1994). Tracking HIV during disease progression. *Curr Opin Immunol*. **6**: 600-604.
- Pantaleo, G., Graziosi, C. and Fauci, A.S. (1993). The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin Immunol*. **5**: 157-163.
- Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O.J., Demarest, J.F., Montefiori, D., Orenstein, J.M., Fox, C., Schragar, L.K. and et al. (1995). Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. **332**: 209-216.
- Perelson, A.S., Essunger, P. and Ho, D.D. (1997). Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *Aids*. **11**: S17-24.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. and Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. **271**: 1582-1586.
- Piatak, M., Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M. and Lifson, J.D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. **259**: 1749-1754.

- Pinto, L.A., Sullivan, J., Berzofsky, J.A., Clerici, M., Kessler, H.A., Landay, A.L. and Shearer, G.M. (1995). ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *Journal of Clinical Investigation*. **96(2)**: 867-876.
- Piris, M.A., Rivas, C., Morente, M., Rubio, C., Martin, C. and Olivia, H. (1987). Persistent and generalized lymphadenopathy: a lesion of follicular dendritic cells? An immunohistologic and ultrastructural study. *Am J Clin Pathol*. **87**: 716-724.
- Plata, F., Autran, B., Martins, L.P., Wain-Hobson, S., Raphael, M., Mayaud, C., Denis, M., Guillon, J.M. and Debre, P. (1987). AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature*. **328**: 348-351.
- Popov, J., McGraw, T., Hofmann, B., Vowels, B., Shum, A., Nishanian, P. and Fahey, J.L. (1992). Acute lymphoid changes and ongoing immune activation in SIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **5**: 391-399.
- Powell, J.D., Bednarik, D.P., Folks, T.M., Jehuda-Cohen, T., Villinger, F., Sell, K.W. and Ansari, A.A. (1993). Inhibition of cellular activation of retroviral replication by CD8+ T cells derived from non-human primates. *Clin Exp Immunol*. **91**: 473-481.
- Preston, B.D., Poiesz, B.J. and Loeb, L.A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. **242**: 1168-1171.
- Prevec, L., Christie, B.S., Laurie, K.E., Bailey, M.M., Graham, F.L. and Rosenthal, K.L. (1991). Immune response to HIV-1 gag antigens induced by recombinant adenovirus vectors in mice and rhesus macaque monkeys. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **4**: 568-576.
- Putkonen, P., Warstedt, K., Thorstensson, R., Benthin, R., Albert, J., Lundgren, B., Oberg, B., Norrby, E. and Biberfeld, G. (1989). Experimental infection of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with simian immunodeficiency virus (SIVsm). *J Acquir Immune Defic Syndr*. **2**: 359-365.
- Pyra, H., Boni, J. and Schupbach, J. (1994). Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**: 1544-1548.
- Quinn, T.C. (1987). AIDS in Africa: evidence for heterosexual transmission of the human immunodeficiency virus. *N Y State J Med*. **87**: 286-289.
- Refaeli, Y., Levy, D.N. and Weiner, D.B. (1995). The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 3621-3625.
- Reimann, K.A., Tenner-Racz, K., Racz, P., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Lin, W., Ransil, B.J. and Letvin, N.L. (1994). Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol*. **68**: 2362-2370.
- Reitz, M.S., Jr., Wilson, C., Naugle, C., Gallo, R.C. and Robert-Guroff, M. (1988). Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell*. **54**: 57-63.
- Rey-Cuille, M.A., Berthier, J.L., Bomsel-Demontoy, M.C., Chaduc, Y., Montagnier, L., Hovanessian, A.G. and Chakrabarti, L.A. (1998). Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol*. **72**: 3872-3886.
- Riviere, Y., Robertson, M.N. and Buseyne, F. (1994). Cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus infection: regulator genes. *Curr Top Microbiol Immunol*. **189**: 65-74.

- Robert-Guroff, M., Brown, M. and Gallo, R.C. (1985). HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature*. **316**: 72-74.
- Roberts, J.D., Bebenek, K. and Kunkel, T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. **242**: 1171-1173.
- Romeu, J., Balague, M., Ruiz, L., Marfil, S., Gatell, J.M., Puig, T., Arno, A., Tural, C., Sirera, G. and Clotet, B. (1999). Short-term risk for AIDS-indicator diseases predicted by plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocytes. *Scand J Infect Dis*. **31**: 37-42.
- Rouse, B.T., Norley, S. and Martin, S. (1988). Antiviral cytotoxic T lymphocyte induction and vaccination. *Rev Infect Dis*. **10**: 16-33.
- Rowland-Jones, S., Sutton, J., Ariyoshi, K., Dong, T., Gotch, F., McAdam, S., Whitby, D., Sabally, S., Gallimore, A., Corrah, T. and et al. (1995). HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med*. **1**: 59-64.
- Rusche, J.R., Javaherian, K., McDanal, C., Petro, J., Lynn, D.L., Grimaila, R., Langlois, A., Gallo, R.C., Arthur, L.O., Fischinger, P.J. and et al. (1988). Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**: 3198-3202.
- Safrit, J.T., Andrews, C.A., Zhu, T., Ho, D.D. and Koup, R.A. (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J Exp Med*. **179**: 463-472.
- Saifuddin, M., Parker, C.J., Peeples, M.E., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S., Ghassemi, M., Rooney, I.A., Atkinson, J.P. and Spear, G.T. (1995). Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med*. **182**: 501-509.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J. and Gething, M.J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. **342**: 224-225.
- Sastry, K.J. and Arlinghaus, R.B. (1991). Identification of T-cell epitopes without B-cell activity in the first and second conserved regions of the HIV Env protein. *Aids*. **5**: 699-707.
- Schellekens, P.T., Tersmette, M., Roos, M.T., Keet, R.P., de Wolf, F., Coutinho, R.A. and Miedema, F. (1992). Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. *Aids*. **6**: 665-669.
- Schmitz, J., van Lunzen, J., Tenner-Racz, K., Grossschupff, G., Racz, P., Schmitz, H., Dietrich, M. and Hufert, F.T. (1994). Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia. *J Immunol*. **153**: 1352-1359.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L. and Reimann, K.A. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. **283**: 857-860.

- Schultz, A.M. and Hu, S.L. (1993). Primate models for HIV vaccines. *Aids*. **7**: S161-170.
- Schultz, A.M. and Stott, J.E. (1994). Primate models for AIDS vaccines. *AIDS*. **8 (suppl. 1)(suppl. 8)**: 203-212.
- Schwiebert, R. and Fultz, P.N. (1994). Immune activation and viral burden in acute disease induced by simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14: correlation between in vitro and in vivo events. *J Virol*. **68**: 5538-5547.
- Sharp, P.M., Robertson, D.L., Gao, F. and Hahn, B.H. (1994). Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS*. **8**: 27.
- Shen, L., Chen, Z.W., Miller, M.D., Stallard, V., Mazzara, G.P., Panicali, D.L. and Letvin, N.L. (1991). Recombinant virus vaccine-induced SIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Science*. **252**: 440-443.
- Shibata, R., Kawamura, M., Sakai, H., Hayami, M., Ishimoto, A. and Adachi, A. (1991). Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*. **65**: 3514-3520.
- Shiver, J.W., Perry, H.C., Davies, M.E., Freed, D.C. and Liu, M.A. (1995). Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann N Y Acad Sci*. **772**: 198-208.
- Siebelink, K.H., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., de Ronde, A., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F. and Osterhaus, A.D. (1995). Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Virol*. **69**: 3704-3711.
- Simmonds, P., Beatson, D., Cuthbert, R.J., Watson, H., Reynolds, B., Peutherer, J.F., Parry, J.V., Ludlam, C.A. and Steel, C.M. (1991). Determinants of HIV disease progression: six-year longitudinal study in the Edinburgh haemophilia/HIV cohort. *Lancet*. **338**: 1159-1163.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F. and Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. **4**: 1032-1037.
- Simon, M.A., Brodie, S.J., Sasseville, V.G., Chalifoux, L.V., Desrosiers, R.C. and Ringler, D.J. (1994). Immunopathogenesis of SIVmac. *Virus Res*. **32**: 227-251.
- Sissons, J.G. and Oldstone, M.B. (1980). Killing of virus-infected cells: the role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection. *J Infect Dis*. **142**: 442-448.
- Spear, G.T., Sullivan, B.L., Landay, A.L. and Lint, T.F. (1990). Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by complement occurs by viral lysis. *J Virol*. **64**: 5869-5873.
- Stahl, R.E., Friedman-Kien, A., Dubin, R., Marmor, M. and Zolla-Pazner, S. (1982). Immunologic abnormalities in homosexual men. Relationship to Kaposi's sarcoma. *Am J Med*. **73**: 171-178.
- Stanley, S., Ostrowski, M.A., Justement, J.S., Gantt, K., Hedayati, S., Mannix, M., Roche, K., Schwartzentruber, D.J., Fox, C.H. and Fauci, A.S. (1996). Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*. **334**: 1222-1230.

- Staprans, S.I., Dailey, P.J., Rosenthal, A., Horton, C., Grant, R.M., Lerche, N. and Feinberg, M.B. (1999). Simian immunodeficiency virus disease course is predicted by the extent of virus replication during primary infection. *J Virol.* **73**: 4829-4839.
- Staprans, S.I., Hamilton, B.L., Follansbee, S.E., Elbeik, T., Barbosa, P., Grant, R.M. and Feinberg, M.B. (1995). Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J Exp Med.* **182**: 1727-1737.
- Stevenson, M., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P. and Lamonica, C.A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J.* **9**: 1551-1560.
- Stoiber, H., Clivio, A. and Dierich, M.P. (1997). Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol.* **15**: 649-674.
- Sullivan, B.L., Knopoff, E.J., Saifuddin, M., Takefman, D.M., Saarloos, M.N., Sha, B.E. and Spear, G.T. (1996). Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J Immunol.* **157**: 1791-1798.
- Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff, E.N., Wang, R., Fisher, D. and Stevenson, M. (1999). HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med.* **5**: 997-103.
- Taylor, J.M., Schwartz, K. and Detels, R. (1986). The time from infection with human immunodeficiency virus (HIV) to the onset of AIDS. *J Infect Dis.* **154**: 694-697.
- Ten Haaf, P., Verstrepen, B., Uberla, K., Rosenwirth, B. and Heeney, J. (1998). A pathogenic threshold of virus load defined in simian immunodeficiency virus- or simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol.* **72**: 10281-10285.
- Tenner-Racz, K. and Racz, P. (1995). Follicular dendritic cells initiate and maintain infection of the germinal centers by human immunodeficiency virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* **201**: 141-159.
- Tenner-Racz, K., Racz, P., Dietrich, M. and Kern, P. (1985). Altered follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS and AIDS-related lymphadenopathy. *Lancet.* **1**: 105-106.
- Toth, F.D., Szabo, B., Ujhelyi, E., Paloczi, K., Horvath, A., Fust, G., Kiss, J., Banhegyi, D. and Hollan, S.R. (1991). Neutralizing and complement-dependent enhancing antibodies in different stages of HIV infection. *Aids.* **5**: 263-268.
- Trono, D. (1995). HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell.* **82**: 189-192.
- Tsujimoto, H., Cooper, R.W., Kodama, T., Fukasawa, M., Miura, T., Ohta, Y., Ishikawa, K., Nakai, M., Frost, E., Roelants, G.E. and et al. (1988). Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol.* **62**: 4044-4050.
- Vanden Haesevelde, M.M., Peeters, M., Jannes, G., Janssens, W., van der Groen, G., Sharp, P.M. and Saman, E. (1996). Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology.* **221**: 346-350.
- Venet, A., Bourgault, I., Aubertin, A.M., Kiény, M.P. and Levy, J.P. (1992). Cytotoxic T lymphocyte response against multiple simian immunodeficiency virusA (SIV) proteins in SIV-infected macaques. *J Immunol.* **148**: 2899-2908.

- Verani, P., Butto, S., Taddeo, B., Federico, M. and Rossi, G.B. (1993). HIV variability and perspectives for a vaccine. *Vaccine*. **11**: 542-544.
- Volberding, P.A., Lagakos, S.W., Koch, M.A., Pettinelli, C., Myers, M.W., Booth, D.K., Balfour, H.H., Jr., Reichman, R.C., Bartlett, J.A., Hirsch, M.S. and et al. (1990). Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med*. **322**: 941-949.
- Walker, B.D. and Plata, F. (1990). Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *Aids*. **4**: 177-184.
- Watson, A., Ranchalis, J., Travis, B., McClure, J., Sutton, W., Johnson, P.R., Hu, S.L. and Haigwood, N.L. (1997). Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol*. **71**: 284-290.
- Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. **373**: 117-122.
- Weiss, R.A., Clapham, P.R., Cheingsong-Popov, R., Dalgleish, A.G., Carne, C.A., Weller, I.V. and Tedder, R.S. (1985). Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature*. **316**: 69-72.
- Wood, G.S., Garcia, C.F., Dorfman, R.F. and Warnke, R.A. (1985). The immunohistology of follicle lysis in lymph node biopsies from homosexual men. *Blood*. **66**: 1092-1097.
- Yagita, M., Noda, I., Maehara, M., Fujieda, S., Inoue, Y., Hoshino, T. and Saksela, E. (1992). The presence of concanavalin-A(Con-A)-like molecules on natural-killer (NK)-sensitive target cells: their possible role in swainsonine- augmented human NK cytotoxicity. *Int J Cancer*. **52**: 664-672.
- Yang, O.O., Kalams, S.A., Rosenzweig, M., Trocha, A., Jones, N., Koziel, M., Walker, B.D. and Johnson, R.P. (1996). Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. **70**: 5799-5806.
- Yasutomi, Y., Reimann, K.A., Lord, C.I., Miller, M.D. and Letvin, N.L. (1993). Simian immunodeficiency virus-specific CD8+ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *J Virol*. **67**: 1707-1711.
- Yasutomi, Y., Robinson, H.L., Lu, S., Mustafa, F., Lekutis, C., Arthos, J., Mullins, J.I., Voss, G., Manson, K., Wyand, M. and Letvin, N.L. (1996). Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction through DNA vaccination of rhesus monkeys. *J Virol*. **70**: 678-681.

7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze
AIDS	‚acquired immunodeficiency syndrome‘, erworbenes Immunschwächesyndrom‘
b	Base
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	‚clusters of differentiation‘
cpm	‚counts per minute‘
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ELISA	‚enzyme-linked immunosorbant assay‘
<i>env</i>	Gen des Hüllproteins (envelope)
FACS	‚flouescence activated cell scan‘
FDC	Follikulär Dendritische Zellen
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,8 m/sec ²)
<i>gag</i>	Gen des gruppenspezifischen Antigens
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
iv	intravenös
MHC	‚major histocompatibility complex‘, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIP-1 α	‚macrophage inhibitory protein 1 α ‘
MIP-1 β	‚macrophage inhibitory protein 1 β ‘
OD	Optische Dichte
p	Protein
PCR	‚polymerase chain reaction‘, Polymerase-Kettenreaktion
PBMC	‚peripheral blood mononuclear cells‘, periphere mononukleäre Blutzellen
Rh	Rhesusaffen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SAIDS	‚simian acquired immunodeficiency syndrome‘, simianes AIDS
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SU	‚surface‘, Oberflächen
TCR	T-Zell Antigenrezeptor
TM	Transmembran
U	Units

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. R. Kurth danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut sowie für die wertvollen Anregungen und die stets gewährte Unterstützung.

Für die fachliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Ludwig.

Besonders danke ich Herrn Dr. Stephen Norley für die wertvolle Anleitung zu selbständiger wissenschaftlicher Arbeit, für sein Engagement bezüglich meiner Arbeit und die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Schließlich möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit bei folgenden Mitarbeitern bedanken:

Frau Dr. Doris Binninger-Schinzl

Herrn Dr. Cheik Coulibaly

Herrn Oliver Hohn

Herrn Dr. Edgar Holznagel

Herrn Dr. Artur Kaul

Frau Brigitte Lust

Frau Nicole Norley

Frau Krystina Olschewski

Herrn Dr. Roland Plesker

Frau Dörte Radke

Frau Inge Schildger

Herrn Erik Seibold

Frau Julia Seidl

Frau Manuela Schütze

Herrn Stefan Tacke

Frau Karin Vollhardt

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann Dr. Andreas Gran für die kritische Durchsicht und seine Unterstützung und meiner Familie.

Silke Holzammer

Diplom-Biologin

Darmstädter Landstrasse 93 . D-60598 Frankfurt am Main. Telefon 069 62 02 07. E-Mail holsi@pei.de

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und –ort	17. August 1969, Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

Juli 1975 – Juli 1979	Eichendorffschule, Grundschule, Obertshausen
Aug. 1979 – Juli 1981	Eichendorffschule, Förderstufe, Obertshausen
Aug. 1981 – Juli 1985	Hermann Hesse-Schule, Realschule, Obertshausen
Sep. 1989 – Juli 1992	Abendgymnasium für Berufstätige, Offenbach, Abitur, Note: 1,8

Berufsausbildungen

Aug. 1985 – Aug. 1987	Ausbildung zur Arzthelferin, Laborgemeinschaft Dr. Eckart und Dr. Roman, Offenbach
Sept. 1987 – Aug. 1989	Ausbildung zur Medizinisch-technischen-Assistentin, Robert-Gustav-Hufnagel-Schule, Offenbach

Berufstätigkeit

Sept. 1989 – Sept. 1992	Tätigkeit als Medizinisch-technische-Assistentin, Laborgemeinschaft Dr. Eckart und Dr. Roman, Offenbach
-------------------------	--

Hochschulausbildung

ab Okt. 1992	Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main Studium der Biologie
--------------	---

