

## **5 Zusammenfassung**

Die biologischen, immunologischen und molekularbiologischen Eigenschaften von HIV-2ben Reisolaten aus experimentell infizierten Affen wurden untereinander und mit dem Ausgangsvirus verglichen.

Nach einer 7-monatigen Tierpassage isoliertes Virus war im Wirtszellspektrum, durch Replikationsgeschwindigkeit und Zytotoxizität vom Ausgangsvirus nicht zu unterscheiden.

Beim immunologischen Vergleich der Virusreisolate durch Western Blots zeigten sich keine Veränderungen in der Größe und den immunologischen Reaktionen der Virusproteine. Es fiel lediglich das sporadische Auftreten eines verkürzten TMP auf, das in späteren Untersuchungen allerdings nicht mit dem Auftreten eines Stopkodons erklärt werden konnte.

Nach Restriktionskartierung der Reisolate zeigte sich, daß eine neue Schnittstelle für KpnI in den Reisolaten eines Tieres auftrat, die im pol-Gen liegt.

Durch PCR und Sequenzierung proviraler Sequenzen aus der DNA peripherer Blutlymphozyten infizierter Tiere sollten die Veränderungen von HIV-2ben im Tier in vivo erfaßt werden. Dazu wurde die PCR optimiert und ihre Nachweisgrenze ermittelt. Diese lag bei 10 proviralen Kopien bzw. bei 2,5 infizierten Kulturzellen. Die Amplifizierbarkeit von Bereichen aus der Makaken-DNA wurde mit dem  $\beta$ -Globin-Gen als internem Standard gezeigt.

Es gelang, provirale Sequenzen in peripheren Blutlymphozyten von experimentell mit SIVmac infizierten Rhesusaffen und eines HIV-2 Patienten nachzuweisen, nicht aber von HIV-2ben infizierten Makaken. Die Anzahl infizierter Blutzellen in den HIV-2ben infizierten Affen war kleiner als 1:25.000. Daher wurden die Lymphknoten als mögliches Virusreservoir vermutet. Aus operativ entnommenen Lymphknoten wurde DNA isoliert und HIV-2-Sequenzen mit der PCR amplifiziert. Mit zwei verschiedenen Primerpaaren gelang sporadisch der Nachweis proviraler Sequenzen. Das läßt auf eine unterschiedliche Verteilung von Provirus in verschiedenen Geweben schließen und weist auf die Lymphknoten als mögliches Virusreservoir hin.

Um dennoch die in vivo Variabilität von HIV-2ben in Makaken zu untersuchen, wurde Virus durch Kokultivierung reisoliert und die provirale DNA aus der Kultur amplifiziert und sequenziert. Beim Vergleich der ermittelten Sequenzen zeigte sich eine starke Homologie zu dem zur Infektion der Affen benutzten Ausgangsisolat. Die Reisolate der mit Wildtyp infizierten Affen zeigten im Verlauf der Infektion eine Anzahl verschiedener Genotypen, die untereinander und zum Primärisolat aus dem

Patienten eine hohe Homologie hatten. Ein Trend zur Entwicklung eines bestimmten Genotyps im Verlauf der Infektion konnte nicht beobachtet werden. Dagegen entsprachen die Reisolatate aus dem mit molekular kloniertem Virus infizierten Tier mit einer Abweichung der Sequenz des MK6. Dieses zeigt deutlich, daß HIV-2ben im Verlauf der Infektion in Makaken keiner hohen Variabilität unterliegt. Der nur einen Genotyp von HIV-2ben darstellende molekulare Klon kann aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen kloniertem und nicht kloniertem Virus nicht als repräsentativ für das Virusisolat gelten. In keinem der mit nicht kloniertem Virus infizierten Tiere wurde die MK6 Sequenz gefunden.

Die aus den Reisolaten und der Lymphknoten-DNA ermittelten Sequenzen sind untereinander sowie zu dem Primärisolat aus dem Patienten weitgehend homolog. Deshalb können die in den Reisolaten ermittelten Sequenzen als repräsentativ für den zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Tier vorherrschenden Genotyp gelten. Die von MEYERHANS et al. (1989) anhand von Untersuchungen des HIV-1 tat-Gens aufgestellte These "to culture is to disturb" kann durch diese Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die Variabilität von HIV-2ben in Makaken ist sehr gering. Trotzdem ist an diesem Modell die Möglichkeit gegeben, pathophysiologische Untersuchungen zur Viruspersistenz durchzuführen, sowie Vakzinen zu entwickeln und zu erproben. Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden könnten auftretende Veränderungen des Virus unter dem Einfluß einer medikamentösen Therapie oder einer therapeutischen Impfung untersucht werden.

**TOLLE, TANJA KATHARINA: Biological, serological und molecular characterization of HIV-2 isolates from experimentally infected macaques**

**6 Summary**

The biological, immunological and molecular biological properties of isolated HIV-2ben from experimentally infected monkeys were studied and compared with the parental virus.

Virus isolated after seven months p.i. showed no differences to the parental virus in cell tropism, replication capacity and cytopathogenicity.

Immunological studies by western blotting showed no changes of size or immunological reactivity of the viral proteins. In some isolates the TMP was truncated. This alteration could not be explained by a stopcodon in further studies.

Restriction enzyme analysis of the isolates revealed the appearance of a new KpnI restriction site in the pol-ORF in one animal.

The in vivo variability of HIV-2ben should be studied directly in PBL-DNA by PCR and sequencing. The conditions of PCR were optimized and the limit of detection was ascertained. By PCR ten proviral copies or 2.5 infected culture cells could be detected. Amplificability of the macaque DNA was shown with primers for the  $\beta$ -globin gene as an internal standard.

Proviral sequences from rhesus monkeys experimentally infected with SIVmac and one HIV-2 patient could be detected directly in PBL-DNA. The virus load in PBL of these macaques was below the limit of detection and thus less than one in 25.000 PBL was infected. To investigate a possible enrichment of infected cells in lymphnodes extirpated tissue was examined by PCR. With two different primer pairs it was possible to sporadically detect proviral sequences. This shows a variable virus load in the different body compartments and suggests the lymphnode as a possible virus reservoir.

To be able to investigate the in vivo variability of HIV-2ben in macaques virus was isolated by cocultivating PBL. Proviral sequences from these cultures were amplified and sequenced. Comparison of these sequences showed a strong relationship of the isolates to the virus that was used for infection. The isolates of the wildtype infected monkeys revealed a number of different genotypes in the course of infection. These were highly related to each other and to the primary isolate from the patient. There was no trend towards the development of a distinct genotype during infection. Isolates of an animal infected with molecularly cloned virus matched the sequence of

MK6 except for one mutation. This shows a very low variability of HIV-2ben in macaques. Because of the observed differences between the cloned viral DNA and sequenced isolates, the cloned MK6 sequence cannot be regarded as representative for HIV-2ben. In none of the animals infected with wildtype virus the MK6 sequence was observed.

Sequences of the isolates, proviral sequences from lymphnode DNA and the virus that was used for infection showed a very close relationship. The sequences obtained in the isolates can therefore be regarded as representative for the predominant genotype at the moment of bleeding. The slogan of MEYERHANS et al. (1989) "to culture is to disturb" can not be verified by this study.

The variability of HIV-2ben in macaques is very low. Nevertheless, this model is useful to develop and test vaccines. Variability of the virus included by drug therapy or therapeutical vaccination can be studied by the methods used in this study.