

5 Zusammenfassung

Die Infektion von Makaken mit SIV gehört zu den häufigsten Tiermodellen in der AIDS-Forschung. Infektions- und Krankheitsverlauf weisen bei HIV-positiven Menschen und SIV-infizierten Rhesusaffen weitgehende Übereinstimmungen auf. So gehören z. B. CD4-positive T-Lymphozyten zu den Zielzellen der Lentiviren. Beiden Erregern kommt bei der Entwicklung und Unterhaltung einer tödlich endenden Immundefizienz die Schlüsselrolle zu. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Vorgänge an lymphatischen Geweben und die Frage, in welchen Zellen die Viren der anfänglich noch gut funktionierenden Immunabwehr entgehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, spezifische Methoden zum Nachweis von SIV in Zellkulturen und im Gewebe von experimentell infizierten Affen zu etablieren. Weiterhin sollte eine zur Virusvermehrung verwendete Zellkultur vor und nach der Infektion mit SIV morphologisch charakterisiert werden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die transformierten Zellen der T-Lymphozytenzellkultur „C8166“ waren trotz ihrer monoklonalen Herkunft ausgesprochen heterogen. Sowohl die Zellgrößen als auch die Kernformen variierten erheblich. Die Zellen wiesen Charakteristika lymphozytärer und monozytärer Zellen auf und ihre Ultrastruktur sprach für eine hohe Stoffwechselaktivität. Sie zeigten Veränderungen, die man auch bei anderen neoplastischen hämatopoetischen Zellen findet. Obwohl die Zellen durch eine Infektion mit HTLV immortalisiert worden waren, fanden sich vor der SIV-Infektion keine Anzeichen einer retroviralen Replikation.
2. Bereits 18 Stunden nach der Infektion mit SIV traten die ersten multinukleären Zellen in der Kultur auf, die Virusproduktion setzte am 2. Tag p. i. ein. Im weiteren Beobachtungszeitraum konnten Riesenzellen und Viren immer nur phasenweise und gemeinsam gesehen werden. Nach Phasen hoher Virusreplikation war der Anteil an degenerierten und nekrotischen Zellen besonders hoch. Diese Befunde sprechen für eine direkte zellschädigende Wirkung von SIV. Aufgrund vermehrter Zellkontakte der Zellen mit Verlust der Membranintegrität ist die Entstehung der Riesenzellen mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Fusion von Zellen zurückzuführen. Insgesamt ent-

sprechen die Veränderungen der SIV-infizierten Zellkultur C8166 den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen in HIV-positiven Kulturen.

3. Bei der Austestung von Antikörpern für den immunhistologischen Nachweis von SIV-Proteinen erwies sich der als „Maus 6“ bezeichnete monoklonale Antikörper, der in der Abteilung für Virologie und Immunologie des DPZ hergestellt wurde, als geeignet für den Nachweis am Gefrierschnitt. Die vom MRC AIDS Reagent Project zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper KK70 und KK75 können hingegen am Paraplastschnitt eingesetzt werden. Bei der exemplarischen Untersuchung verschiedener Organen, die histologisch SIV-bedingte Alterationen zeigten, wurde die Verlässlichkeit der Antikörper überprüft und das Verteilungsmuster von SIV-Antigen mit dem in der Literatur beschriebenen verglichen. Es wurde festgestellt, daß die Antikörper hervorragend für den immunhistochemischen SIV-Nachweis mittels SABC-Technik geeignet sind.
4. Ferner wurde eine *in situ* Hybridisierung (ISH) zur Darstellung von viraler Nukleinsäure etabliert. Nach Herstellung verschiedener, nicht radioaktiv-markierter Sonden wurde ein Protokoll für die *in situ* Hybridisierung in Zellkulturen etabliert und dieses auf Paraplastschnitte übertragen. Es wurden ausgesuchte Organschnitte mit Hilfe der ISH untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß sich die 0,9 kb lange Sonde gut für den Nachweis von viraler Ribonukleinsäure eignet.
5. Das Verteilungsmuster der immunhistochemisch nachgewiesenen viralen Proteine wurde mit den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung verglichen. Es zeigte sich, daß bei beiden Methoden überwiegend die gleichen Zellen angefärbt wurden. Unterschiedliche Beobachtungen sind teilweise darauf zurückzuführen, daß manche Zellen im frühen Replikationsstadium zunächst nur virale RNA, aber noch keine Proteine enthalten. Zum anderen reagierten immunhistochemisch follikulär dendritische Zellen, die Antigene nur auf ihrer Oberfläche exprimieren, ohne selbst infiziert zu sein.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß beide Methoden von großer Bedeutung für die Untersuchung der frühen Infektionsphase, besonders in lymphatischen Geweben, sind und sich sinnvoll ergänzen.

Summary

Petra Hünnerbein (1997)

Morphological methods for detection of SIV and their use in cell culture and in tissue of experimentally infected rhesus monkeys

The infection of macaques with SIV is one of the most frequently used animal models in AIDS research. Progression of infection and of disease in HIV-positive human beings and SIV-infected rhesus monkeys are quite similar. For example CD4-positive T-lymphocytes belong to the target cells of both lentiviruses and they both play a key role in the initiation and propagation of a deadly immunodeficiency. Of special interest are the changes in lymphoid tissue and the question, in which cell type viruses escape from the initially well functioning immune system.

The purpose of this study was to develop specific methods for the detection of SIV in cell cultures and in tissue samples from experimentally infected monkeys. Furthermore a cell culture, used for virus propagation, was characterized morphologically before and after infection with SIV. The following results were obtained:

1. The transformed cells of the T-cell culture "C8166" were despite their monoclonal nature very heterogeneous. Not only the shape of the nucleus but also the size of the entire cell changed considerably. Cells showed characteristic features of both, lymphoid and monocytic origin. Their ultrastructure showed high metabolic activity and changes also seen in neoplastic hematopoietic cells. Although cells were immortalized by infection with HTLV, there was no sign of retroviral replication before SIV infection.
2. 18 hours after infection with SIV the first multinucleated cells appeared and on day two *p. i.* virus replication started. Afterwards giant cells and viral particles could only be seen periodically and simultaneously. After phases of increased virus replication the amount of degenerated and necrotic cells was extremely high. These results suggest a direct damage of cells by the virus itself. The increase of cell-to-cell contacts with loss of membrane integrity point out the possibility of cell fusion as cause of the multinucleated cells. On

the whole the morphological alterations observed in this cell culture are the same changes that are seen by other authors in HIV infected cultures.

3. Searching antibodies suitable for immunohistochemical purposes the monoclonal antibody "Maus 6", generated from the Department of virology and immunology of the German Primate Center in Göttingen, proved to work in cryo-sections. In contrast to this the monoclonal antibodies KK70 and KK75, obtained from the MRC AIDS Reagent Project in England, can be used for antigen detection in paraplast-embedded tissue. The reliability of the antibodies and the distribution of viral proteins were checked in sections from different organs representing typical SIV alterations. These results were compared with results of other authors. The antibodies proved to be of excellent use for immunohistochemical demonstration of SIV antigen by SABC technique.
4. Moreover an *in situ* hybridization (ISH) for the detection of viral nucleic acids was established as a method. For this purpose different non-radioactive labelled probes were generated and a protocol for hybridization, performed in cell cultures, was designed and transferred to paraplast-sections. Sections of selected organs were examined by ISH and it was found that a 0.9 kb long probe is suitable for the detection of viral ribonucleic acids.
5. The distribution of the immunohistochemically detected viral proteins was compared with the results obtained by ISH. It was mostly the same type of cell that showed a colour reaction. Differences in result were due to the fact that some cells, at the beginning of viral replication, contain only viral RNA and no proteins yet. Besides, follicular dendritic cells contain antigens within their outer membrane without being infected.

The results of this study show that both methods, immunohistochemistry and *in situ* hybridization, supplement each other and are of utmost importance for the study of the course of infection especially in lymphatic tissue.