

## 5 Zusammenfassung

Mit SIV infizierte Rhesusaffen haben sich in der Vergangenheit als wertvolles Tiermodell für die Pathogenese-, Therapie- und Impfstoffstudien in der AIDS Forschung bewährt. Da vor allem die pathogenetischen Vorgänge in der Frühphase der HIV Infektion aufgrund von fehlendem oder lückenhaftem Probenmaterial der Patienten nicht untersucht werden können, bietet sich die Untersuchung dieser Parameter im Tiermodell an. Als größtes lymphatisches Kompartiment des Körpers hat der Magen-Darmtrakt einen entscheidenden Anteil an der Immunpathogenese der SIV Infektion. Ferner ist er von einer Vielzahl opportunistischer Infektionen im Verlaufe der Erkrankung betroffen. Kenntnisse über die Höhe der Virusbeladung und Virusreplikation sind dabei von grundlegender Bedeutung für die Prognose des zu erwartenden Krankheitsverlaufes. Als Methode der Wahl hat sich die quantitative, kompetitive PCR für eine korrekte Bestimmung der in der Probe vorhandenen Kopienzahl viraler Nukleinsäuren erwiesen.

1. Es konnte eine kompetitive PCR zur Quantifizierung der Proviruslast etabliert werden. Die Primer liegen im *nef*-Gen von SIV<sub>mac</sub>251. Die Amplifikationseffizienz von Wildtyp und Kompetitor stimmt überein. Die Probenverluste liegen bei 12,5%, und es können Kopienzahlen zwischen 300 und 100.000 Molekülen in 100.000 Zellen quantifiziert werden.
2. Die kompetitive RT-PCR konnte erfolgreich auf der Ebene von *in vitro* transkribierter RNA etabliert werden. Eine Quantifizierung ist zwischen 1000 und 100.000 Molekülen eingesetzter RNA möglich. Die Probenverluste liegen durchschnittlich bei 52%. Wildtyp und Kompetitor weichen in 18,75% ihrer Amplifikationseffizienz voneinander ab.
3. Bei einem Infektionsexperiment mit vier intrarektal und vier intravenös infizierten mit SIV<sub>mac</sub>251 MPBMC infizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), wurden Darmbiopsien aus dem Duodenum, Kolon und Rektum zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion genommen. Mit Hilfe der kompetitiven PCR konnte in der überwiegenden Zahl der Biopsien SIV Provirus nachgewiesen werden. Negative Proben wurden vor allem zum Ende der Infektion gefunden. Bei den Tieren mit einer niedrigen Virusbeladung wurden vermehrt Biopsien gefunden, deren Proviruslast zu schwach für eine korrekte kompetitive Quantifizierung war.

4. Die Inokulationsroute hatte weder einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Virusbeladung noch auf die Überlebenszeit der Tiere. Die Virusbeladung hat jedoch einen signifikanten Einfluß auf die Überlebenszeit der Tiere und umgekehrt. Bis zur vierten Woche p. i. konnte eine negative Korrelation zwischen der Überlebenszeit und der Virusbeladung festgestellt werden. Diese war jedoch bei der getrennten Untersuchung der Entnahmelokalisationen nur im Duodenum durchgängig festzustellen. Im Duodenum und Kolon wurden häufig höhere Kopienzahlen ermittelt als im Rektum. Das Duodenum scheint die aussagekräftigsten Ergebnisse für den Infektionsverlauf zu liefern.
5. Auf der Ebene der Proviruslast konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Meßwerten und der Überlebenszeit gezeigt werden.

Somit lassen sich prognostische Aussagen zum Krankheitsverlauf mit Hilfe intestinaler Biopsien, die neben pathomorphologischen Untersuchungen auch parallele DNA-PCR zur Quantifizierung der Proviruslast ermöglichen, treffen. Dies gilt besonders für Infektionszeitpunkte, an denen klinische Krankheitszeichen noch nicht aufgetreten sind.

## Summary

**Andrea Didier (1999)**

### **Establishing a quantitative competitive PCR and RT-PCR for the detection of proviral DNA and viral RNA in intestinal biopsies of SIV infected rhesus monkeys.**

In the past SIV infected rhesus monkeys have proved to be a valuable animal model for pathogenetical, therapeutical and vaccine studies in AIDS research. Since the pathogenetical events in the early stages of disease cannot be investigated in humans because of unavailable or incomplete samples from the patients investigation of these parameters in an animal model provides a suitable solution for this problem. As the largest lymphoid compartment of the body the GI-tract plays a crucial role in the immunopathogenesis of SIV infection. In addition it is affected by a large number of opportunistic infections during the course of disease. Knowledge of the amount of viral load and viral replication are therefore of basic importance for prognosis of the expected course of disease. Quantitative competitive PCR proved to be the method of choice for a correct quantification of viral nucleic acid copy numbers in a sample.

1. A competitive PCR for the quantification of proviral load could be established. Primers are located in the *nef* gene of SIV<sub>mac</sub>251. Amplification efficiency of wildtyp and competitor are equal. Loss of material during sample preparation is at 12,5% and copy numbers between 300 and 100.000 molecules per 100.000 cells can be quantified.
2. A competitive RT-PCR could successfully be established on the level of *in vitro* transcribed RNA. Quantification is possible between 1000 and 100.000 added RNA. Mean loss of material during sample preparation is at 52% and wildtyp and competitor differ in 18,75% of their amplification efficiency.
3. In an SIV infection experiment with four intrarectally and four intravenously infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*) using SIV<sub>mac</sub>251 MPBMC intestinal biopsies have been collected at different times after infection. By the means of quantitative PCR SIV provirus could be detected in most of the biopsies. Samples which tested negatively were predominately found at the end

tinal biopsies have been collected at different times after infection. By the means of quantitative PCR SIV provirus could be detected in most of the biopsies. Samples which tested negatively were predominately found at the end stage of infection. In animals with a low proviral load an increased number of biopsies was found with proviral load too weak for a correct quantification.

4. The route of virus inoculation had neither significant influence on virus load nor on survival time of the animals. However virus load showed a significant influence on survival time and vice versa. Up to the fourth week after infection a negative correlation between survival and virus load was found. Separate analysis according to the different localisation of the biopsies however only confirmed this trend continuously in duodenum. In duodenum and colon higher copy numbers were detected than in rectum. Therefore the duodenum seemed to provide the most meaningful results for the course of infection.
5. A significant relationship between measurement and time of survival could be demonstrated on the level of proviral load.

Intestinal biopsies, which allow DNA-PCR quantification of proviral load in addition to pathomorphological studies, facilitate prognostic statements on the course of disease. This is especially valid during the early stages of infection, when clinical signs of disease are not obvious.