

Korrelation von Organpathologie und Verteilung virusreplizierender Zellen, nachgewiesen mit der RNA *in situ* Hybridisierung während der SIVmac-Infektion von *Macaca mulatta*¹

Correlation of Organ Pathology and Distribution of SIV detected by *in situ* Hybridization during SIVmac Infection of *Macaca mulatta*

J. G. MÜLLER², S. CZUB, A. RETHWILM und H. K. MÜLLER-HERMELINK

Summary

22 juvenile rhesus macaques were infected i.v. with SIVmac and killed at defined timepoints after infection. Productively infected cells were detected by RNA *in situ* hybridization in the paraffin material. Their number was correlated with the pathology of lymph nodes, thymus, extranodal lymphatic parenchyma and other organs. In the first weeks all lymphatic tissues and compartments got infected, as well as the brain, the bone marrow and other organs. The high virus replication during this first phase disappeared with the onset of the seroconversion and remained low during all stages of atrophy of the lymphatic parenchyma. The atrophy of the lymphatic parenchyma and its microenvironment was not correlated with virus replication. This may implicate that a virostatic therapy might be more successful in the first weeks of infection.

Einleitung

Die Pathogenese des erworbenen Immundefektsyndromes AIDS ist in wichtigen Punkten nach wie vor ungeklärt. Ein Haupthindernis für unser Verständnis ist, daß die Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen nur mit großer Vorsicht auf pathogenetische Abläufe *in vivo* übertragen werden können. Es hat sich nämlich gezeigt, daß für die Ausbildung des Immundefektes letztlich die Wechselwirkungen zwischen HIV und dem Immunsystem entscheidend sind (FAUCI 1993). So kommt es nach der Infektion durchaus zu einer virusspezifischen humoralen und zellulären Immunreaktion gegen HIV. Gleichzeitig enthält das Virus aber in seiner Hülle auch Epitope, die mit körpereigenen Proteinen identisch sind, wie z. B. MHC-Klasse II Molekülen (GOLDING 1988). Es sind dementsprechend im Serum HIV-Infizierter auch Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen nachweisbar (ZARLING 1990). Beide, virusspezifische und autoreaktive Immunreaktionen, können durch die Elimination virusinfizierter und nichtinfizierter Lymphozyten und Makrophagen zur Selbstzerstörung des Immunsystems führen (PHILLIPS 1991). Beide haben aber natürlich auch erhebliche Auswirkungen auf die Verteilung und Vermehrung des Virus im Organismus (TSUBOTA 1989). Im noch nicht ganz immunkompetenten Organismus ist der Krankheitsverlauf insgesamt kürzer (AUGER 1988). Ohne Immunreaktion würde sich das Virus ungehindert vermehren und zu massiven zytopathischen Effekten führen (siehe das Beispiel unten). Um also die Pathogenese des erworbenen Immundefektsyndromes untersuchen zu können, ist man auf Untersuchungen im immunkompetenten Wirt angewiesen.

Das hierfür am besten geeignete Tiermodell ist die SIV-Infektion von Rhesusaffen (*Macaca mulatta*). Ein Beispiel für die Probleme, die bei der Übertragung von *in vitro* Daten auf die Pathogenese *in vivo* auftreten können, ist die SIV-induzierte Thymusatrophie. Hier hatten *in vitro* Untersuchungen von gereinigten kortikalen Thymozyten oder Untersuchungen von Thymustransplantaten in scid-Mäusen nach HIV-Infektion eine rasche Virusvermehrung und innerhalb weniger Wochen eine schwere Atrophie des Thymus durch Apoptose

¹ Gefördert durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie II-068-88.

² Pathologisches Institut der Universität Würzburg.

virusinfizierter Zellen gezeigt. Die Untersuchungen in SIV-infizierten Rhesusaffen zeigten jedoch während der verschiedenen Phasen der Thymusatrophie eine Reduktion in der Rate apoptotischer kortikaler Thymozyten ($p < 0,001$). Im immunkompetenten Wirt müssen also ganz andere, noch nicht bekannte, Mechanismen zur Thymusatrophie führen. Ihre Folgen sind eine Zerstörung des kortikalen Thymusepithels und die Störung der intrathymischen T-Zell-Reifung (MÜLLER 1993 a).

Material und Methoden

Um zu untersuchen, wann es zur Infektion von Lymphknoten, Thymus, extranodalem lymphatischem Parenchym kommt, welche Kompartimente dieser lymphatischen Organe infiziert werden, und ob die SIV-induzierte Atrophie von Thymus und Lymphknoten mit der Verteilung und Vermehrung des Virus korreliert, wurden juvenile Rhesusaffen mit SIVmac infiziert. Die Tiere wurden im Deutschen Primatenzentrum Göttingen, in der Abteilung von Prof. HUNSMANN, gehalten, und hier wurden auch die Untersuchungen zur Kontrolle der Infektion durchgeführt (Tabelle 1).

Zum Nachweis produktiv SIV-infizierter Zellen wurde am Paraffinmaterial eine *in situ* Hybridisierung mit einer ^{35}S -markierten SIVgag RNA probe von 527 bp Länge durchgeführt. Die Schnitte wurden acetyliert, prähybridisiert, über Nacht bei 45 °C hybridisiert, bei 60 °C mit $0,1 \times \text{SSC}$ gewaschen, und dann zur Autoradiographie je 1 Schnitt für 1 und ein zweiter Schnitt für 2 Wochen exponiert. Positivkontrollen waren SIV-infizierte Tiere mit hoher Virusreplikation und auch ultrastrukturellem Virusnachweis. Negativkontrollen bestanden im Weglassen der Probe, Hybridisierung mit der sense-probe, oder Vorbehandlung mit RNAsen. Die Testung am Paraffinmaterial ermöglichte die Untersuchung des lymphatischen Parenchyms (Thymus, Lymphknoten verschiedener Regionen, und extranodales lymphatisches Parenchym des Darmes und der Lunge) und die Untersuchung anderer Organe (ZNS, Knochenmark, u.a.m.).

Tab. 1: Tierhaltung, Infektion.

Juvenile (2–3 Jahre alt) *Macaca mulatta*.

Frühphase: 100 MID₅₀ (Monkey infective dose) SIVmac251-32H, i.v.

Spätphase: 100 MID₅₀ SIVmac251/32H i.v. und 10^4 TCID (tissue culture infective dose) SIVmac239, i.v.

Versuchsplan	1 wpi	3 wpi	6 wpi	12 wpi	24 wpi	36 wpi
Klinisch gesunde Tiere (N = 11)	1	2	2	2	2	1
Tiere mit AIDS (N = 11)	Lymphome		opportunist. Infektionen		Riesenzell- Enzephalitis	

Ergebnisse

Verteilung von SIV im Organismus, Zahl produktiv infizierter Zellen und die Veränderungen des lymphatischen Parenchyms charakterisieren pathogenetisch verschiedene Phasen der SIV-Infektion: Vor der Serokonversion, also in den ersten 3 Wochen nach Infektion, kommt es zur massiven Virusvermehrung. Infiziert werden in dieser Phase alle lymphatischen Organe: sämtliche Kompartimente der Lymphknoten, alle Kompartimente des Thymus, die weiße Pulpa der Milz, und auch die B- und T-Zone des extranodalen lymphatischen Parenchyms des Darmes (Tabelle 2). In dieser Phase sind produktiv infizierte Zellen auch im Gehirn, der Lunge, dem Knochenmark und sogar im Myokard nachweisbar.

Tab. 2: Verteilung virusreplizierender Zellen im lymphatischen Parenchym.

	1 wpi	3 wpi	> 6 wpi
Thymus			
Kortex	+	++	+/-
Medulla	++	+++	+/-
Lymphknoten			
Randsinus	+	+	+/-
Parakortex	++	++	+/-
Keimzentrum	+	+	

Tab. 3: Virusreplikation und Atrophie des lymphatischen Parenchyms.

N = wpi	1	2	«gesund»		mit AIDS			Kontrollen
			5	6	3	5	3	
	1	3	6-12	24-56	31-122	46-124	20-40	/
Thymus								
Atrophie Kortex				+	++	+++	+++	
Reifungsstörung				+	++	+++	+++	
Lk Keimzentrum								
ruhend	+++	+						
Hyperplasie		++	++	+				
«Fragmentierung»				++	+			
Involution				+	++	+	+	
Verlust					+	+	+	
Lk T-Zone								
bunte Pulpahyperplasie		++			+	++	++	
Atrophie								
<i>in situ</i> Hybridisierung	++	+++	+/-	+/-	+/-	+/-	+++	-

Mit der Serokonversion, die ab der dritten bis vierten Woche bei allen Tieren nachweisbar war, sinkt der Anteil produktiv infizierter Zellen drastisch ab. Die Tiere entwickeln jetzt reaktive Lymphknotenveränderungen (Tabelle 2 und 3). 6 bis 12 Monate nach Infektion kommt es zur Thymusatrophie und zu pathologischen Veränderungen der Lymphknoten, insbesondere der Keimzentren (Tabelle 3). Während der Atrophie von Thymus und Lymphknoten, also in der Phase der Zerstörung der Struktur des lymphatischen Parenchyms, bleibt die Virusvermehrung auf ganz niedrigem Niveau. Bei Tieren mit voll ausgebildetem Immundefekt und AIDS-definierenden Erkrankungen sind 2 Untergruppen zu unterscheiden: Tiere mit weiterhin niedriger Virusvermehrung, und Tiere mit wieder hoher Virusvermehrung. Diese letzte Gruppe war durch eine Riesenzellenzephalitis und Riesenzellpneumonie und einen insgesamt rascheren Krankheitsverlauf charakterisiert (Tabelle 3).

Diskussion

Der Vergleich mit den von der HIV-Infektion des Menschen bekannten Daten zeigt weitgehende Parallelen. So ist bei Menschen 3-6 Wochen nach HIV-Infektion im Serum eine hohe Virämie und Antigenämie nachweisbar. Mit der Serokonversion bilden sich beide zurück (CLARK 1991, DAAR 1991). Überträgt man die Daten aus den Tierexperimenten auf die HIV-Infektion des Menschen, dann wäre zu vermuten, daß es auch beim Menschen bereits

in den ersten Wochen zur Generalisation des Virus und auch zum Befall nicht lymphatischer Organe wie des ZNS oder des Knochenmarks oder der Lungen kommt. Nach der Serokonversion sinkt der Anteil produktiv infizierter Zellen drastisch und erreicht das niedrige Niveau, das auch von Untersuchungen menschlicher Lymphknoten (SPIEGEL 1992, EMBRETSON 1993, PANTALEO 1993) bekannt ist. Bislang liegen im Tierexperiment noch keine Daten über die Menge und Verteilung proviraler DNA vor. Die SIV-infizierten Rhesusaffen entwickeln im weiteren Verlauf der Infektion Veränderungen der Keimzentren, die denen von HIV-infizierten Menschen gleichen (ÖST 1989), und es kommt zur SIV-induzierten Thymusatrophie (MÜLLER 1993 b). Diese Zerstörung der Struktur von Thymus und Lymphknoten war nicht mit einer erhöhten Virusreplikation korreliert. Wenn man diese Befunde auf die HIV-Infektion des Menschen überträgt, dann wäre eine wichtige Schlußfolgerung, daß die Therapie mit Azidothymidin und Analoga in den ersten Tagen und Wochen nach Infektion durchgeführt werden müßte.

Literatur

AUGER, I., P. THOMAS, and V. DEGRUTTOLA: Incubation periods for pediatric AIDS patients. *Nature* 336, 575–577 (1988). – CLARK, S. J., M. S. SAAG, W. D. DECKER, S. CAPBELL-HILL, J. L. ROBERSON, P. J. VELDKAMP, J. C. KAPES, B. H. HAHN, and G. M. SHAW: High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324, 954–960 (1991). – DAAR, E. S., T. MOUDGIL, R. D. MEYER, and D. D. HO: Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324, 961–964 (1991). – EMBRETSON, J., M. ZUPANIC, J. RIBAS, A. BURKE, P. RACZ, K. TENNER-RACZ, and A. T. HAASE: Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362, 359–362 (1993). – FAUCI, A. S.: Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: Implications for therapy *Science* 262, 1011–1018 (1993). – GOLDING, H., F. A. ROBEY, F. T. GATES III, W. LINDER, P. R. BEINING, T. HOFFMAN, and B. GOLDING: Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus 1 gp41 and human MHC class II beta-1 domain. 1. monoclonal antibodies against the gp41 derived peptide and patient's sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J. Exp. Med.* 167, 914–923 (1988). – MÜLLER, J. G., V. KRENN, C. SCHINDLER, S. CZUB, C. STAHL-HENNIG, C. COULIBALY, G. HUNSMANN, C. KNEITZ, T. KERKAU, A. RETHWILM, V. TERMEULEN, and H. K. MÜLLER-HERMELINK: Alterations of thymus cortical epithelium and interdigitating dendritic cells but no increase of thymocyte cell death in the early course of simian immunodeficiency virus infection. *Am. J. Pathol.* 143, 699–713 (1993 a). – MÜLLER, J. G., V. KRENN, S. CZUB, C. STAHL-HENIG, C. COULIBALY, G. HUNSMANN, and H. K. MÜLLER-HERMELINK: The thymic epithelium reticulum and interdigitating cells in SIV-induced thymus atrophy and its comparison with other forms of thymus involution. *Res. Virol.* 144, 93–98 (1993 b). – ÖST, A., C. D. BARONI, P. BIBERFELD, J. DIEBOLD, A. MORAGAS, H. NOEL, G. PALLESEN, P. RACZ, M. SCHIPPER, K. TENNER-RACZ, and J. G. VAN DEN TWEEL: Lymphadenopathy in HIV infection: histological classification and staging. *APMIS Suppl.* 8, 7–15 (1989). – PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, J. F. DEMAREST, L. BUTINI, M. MONTRONI, CH. FOX, J. ORENSTEIN, D. P. KOTLER, and A. S. FAUCI: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362, 355–358 (1993). – PHILLIPS, R., S. ROWLAND-JONES, D. NIXON, F. GOTCH, J. EDWARDS, A. OGUNLESII, J. ELVIN, J. ROTHBARD, C. BANGHAM, C. RIXXA, and A. McMICHAEL: Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354, 453–459 (1991). – SPIEGEL, H., H. HERBST, G. NIEDOBITEK, H.-D. FOSS, and H. STEIN: FDC are a major reservoir for HIV-1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4⁺ T-helper cells. *Am. J. Pathol.* 140, 15–22 (1992). – TSUBOTA, H., C. I. LORD, D. I. WATKINS, C. MORIMOTO, and N. L. LETVIN: A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169, 1421 (1989). – ZARLING, J. M., J. A. LEDBETTER, J. SIAS, P. FULTZ, J. EICHBERG, G. GJERSET, and P. A. MORAN: HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4⁺ cells. *J. Immunology* 144, 2992–2998 (1990).