

5 Zusammenfassung

Das humane Immundefizienzvirus HIV-1 zeichnet sich durch eine hohe Variabilität zwischen den Virusisolaten aus verschiedenen Patienten aus, aber auch durch die Fähigkeit, sich innerhalb eines Patienten im Verlauf der Infektion zu verändern und sogenannte Quasispezies zu bilden. Die genetische Variabilität ist im Hüllprotein von HIV-1 besonders stark ausgeprägt und spiegelt sich im Wirtszelltropismus wider.

Um die Zusammenhänge zwischen genotypischer und phänotypischer Veränderung der vorherrschenden Virusvariante in HIV-1-Patienten näher zu untersuchen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das env-Gen aus dem Blut HIV-1 infizierter Patienten amplifiziert und charakterisiert. Obwohl alle Patienten unter HAART-Therapie standen, war es möglich, das Gen für das Hüllprotein aus insgesamt sechs Patienten zu klonieren. Bei zwei Patienten (H6, D5) war die env-Klonierung aus sequenziellen Blutproben erfolgreich. Die so erhaltenen rekombinanten HIV-1-Klone wurden zunächst genotypisch charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten, dass die V3-Schleife im Vergleich zur V1-V2-Region wenig variabel war. Klone, die aus der selben Blutprobe eines Patienten stammten, wiesen in ihrer Aminosäuresequenz keine, bzw. nur geringe Abweichungen auf. Eine Analyse der Gesamtpopulation zeigte, dass deutliche Sequenzunterschiede zwischen den Klonen der einzelnen Patienten bestehen. Neben Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen unterschiedlichen Patienten konnten auch Substitutionen in den env-Genen beobachtet werden, die aus sequentiellen Blutproben amplifiziert wurden (Patienten H6, U7 und D5).

Die genetische Variabilität spiegelte sich im Phänotyp der Virusklone wider. Korezeptorstudien mit GHOST-Zellen ergaben, dass ein breites Spektrum an unterschiedlichen Korezeptoren genutzt werden konnte: neben CCR5 nutzenden Viren (G17, G19, 12-6,12-7, K5-4, KN3-2) wurde ein dualtroper (CCR5/CXCR4) Virusklon (B2) gefunden und außerdem Viren (A5, C22, H9, H10, H11), die bis zu neun verschiedene Korezeptoren nutzten. Ferner konnte eine Veränderung der genutzten Korezeptoren bei Klonen festgestellt werden, die aus sequenziellen Blutproben eines Patienten stammten (Patienten H6 und D5). Trotz großer Unterschiede bei den *in vitro* genutzten Korezeptoren, zeigte

die Infektion primärer Zellen keine entsprechenden Differenzen zwischen den Virusklonen. Eine Korrelation zwischen dem Phänotyp der rekombinanten Viren und dem Krankheitsstatus der Patienten war nicht erkennbar.

Eine weitergehende Analyse der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp der Virusklone zeigte, dass anhand der Information der V3-Sequenz nicht nur wie erwartet zwischen NSI oder SI-Viren unterschieden, sondern darüber hinaus eine Voraussage gemacht werden kann, ob es sich um dual- bzw. multitrope oder reine CXCR4 nutzende SI-Viren handelt. Diese Vorhersagemethode bietet einen wichtigen Aspekt für die HIV-1 Therapie, da sie es dem behandelnden Arzt ermöglicht, auf einfache Weise, Chemokin-Antagonisten zur Hemmung des Viruseintritts in die Zelle gezielt auszuwählen.

Gut charakterisierte rekombinante Virusklone stellen die Basis für verschiedene *in vitro* Infektionsversuche dar. Besonders interessant sind Studien zur Infizierbarkeit von Thymozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien von der haematopoetischen Stammzelle zur reifen T-Zelle, um auf diese Weise mehr über die HIV-1-Pathogenese zu lernen. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil der Arbeit versucht werden, ein *in vitro* Differenzierungssystem für T-Zellen zu etablieren.

Vorversuche zeigten, dass das Ausgangsmaterial, CD34-positive haematopoetische Stammzellen, für die Differenzierungsversuche geeignet war. Die Präparation der Zellen aus Nabelschnurblut wies eine hohe Reinheit (95-97%) auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stammzellen sowohl über die Fähigkeit zur Proliferation als auch zur Differenzierung verfügten.

Der erste Versuch zur T-Zell-Differenzierung wurde in Kokultur mit der Knochenmarkszelllinie L88 durchgeführt. In den Kokulturen konnte die Entwicklung CD14-positiver, makrophagenähnlicher Zellen beobachtet werden. Es kam jedoch nicht zur Differenzierung von reifen T-Zellen.

In einem zweiten Ansatz sollte versucht werden, ein chimäres FTOC-(fetal thymus organ culture)-System zu etablieren. Zunächst wurden die Kulturbedingungen für die fötalen Organe optimiert. Es gelang dann, die murinen Thymozyten aus den Thymi zu depletieren und humane CD34-positive Zellen einwandern zu lassen. Allerdings wurde nach wenigen Tagen chimärer Organkultur ein Verlust der Stammzellen beobachtet. In zukünftigen Experimenten soll ermittelt werden, weshalb es nicht zur Proliferation und

Differenzierung der humanen Zellen kommt, um auf dieser Grundlage die Bedingungen optimieren zu können.