

Die Quantifizierung von proviraler FIV-DNA mittels kompetitiver PCR

Autor(en): **Allenspach, K. / Amacker, M. / Leutenegger, C.M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **138 (1996)**

Heft 2

PDF erstellt am: **11.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-589672>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Veterinär-Medizinisches Labor, Departement für Innere Veterinärmedizin, ¹Departement für Veterinär-Biochemie, Universität Zürich, ²Departement für Biomedizin, Universität von Pisa

Die Quantifizierung von proviraler FIV-DNA mittels kompetitiver PCR

K. Allenspach, M. Amacker¹, C.M. Leutenegger, M. Hottiger¹, R. Hofmann-Lehmann, U. Hübscher¹, M. Pistello², H. Lutz

Zusammenfassung

Die Quantifizierung von FIV-Provirus in den Lymphozyten (der Menge des integrierten FIV-Provirus, des sogenannten Provirusloads), ist für eine Vielzahl von Experimenten wichtig. Als Beispiele sind zu nennen die Prüfung der Wirksamkeit von spezifischen Therapien oder von Vakzinen. In der vorliegenden Arbeit wird die quantitative kompetitive PCR zur Messung des Provirusloads beschrieben. Der zu quantifizierende Abschnitt des FIV-Genoms wird zusammen mit einer bekannten Menge des verkürzten DNA-Fragmentes mit identischer Nukleotidsequenz und denselben Primerbindungsstellen, dem sogenannten Kompetitor, im gleichen Reaktionsgemisch amplifiziert. Durch Änderung des Verhältnisses der genomischen FIV-DNA zum Kompetitor kommt es zu unterschiedlicher Amplifizierung der beiden Sequenzen. Nach elektrophoretischer Auftrennung können die beiden Banden anhand ihrer unterschiedlichen Grösse erkannt werden. Durch eine densitometrische Analyse der Bandenintensität kann die ursprünglich in der genomischen DNA vorhandene Menge der FIV-DNA berechnet werden. Diese Methode der Quantifizierung des Virusloads in FIV-infizierten Katzen ist sehr sensitiv (Nachweisgrenze für die Kompetitor-DNA = 10 Kopien) und erweist sich als geeignet, um den Virusload während verschiedener Experimente zu bestimmen.

Schlüsselwörter: FIV – Provirusload – HIV-Modell – quantitative kompetitive PCR

Detection and quantification of proviral DNA from feline immunodeficiency virus infected cats

Quantification of provirus copies is important in the context of different biological questions. The most reliable approach for DNA quantification is a PCR based on coamplification of two templates of similar length, the target sequence and the reference template, sharing the same primer recognition sequences. During the amplification, the two templates compete for the same primer set (competitive PCR, or cPCR) and consequently amplify at the same rate independently of the number of cycles. The amplified products can be distinguished by their different lengths. After densitometrical analysis, the proviral copy number of experimentally feline immunodeficiency virus infected cats could be calculated, since a known amount of reference template was used.

The method described here proved to be very sensitive (10 copies for the competitor-DNA) and was used to quantitate the proviral load during several experiments in which the influence of periodical immunestimulations and the effect of vaccines on the virus load was studied.

Key words: FIV – proviral load – model for HIV-infection – quantitative competitive PCR

Einleitung

Durch die Fortschritte auf molekularbiologischem Gebiet wurde in den letzten Jahren die absolute Quantifizierung von Viruspartikeln zugänglich für eine breite Anwendung von Experimenten. In früheren Studien musste für derartige Fragestellungen auf sehr aufwendige und zeitintensive Methoden zurückgegriffen werden,

wie zum Beispiel die Kultivierung von Viren. Einfachere Methoden, die eine Quantifizierung mittels PCR erreichen, ermöglichen dabei schnell neue Erkenntnisse über das Ausmass der viralen Genexpression oder Einsichten über die Virus-Wirts-Interaktionen.

Besonders wichtig erwiesen sich quantitative Aspekte des Virusbefalls bei der HIV- und der FIV-Infektion. Die Latenzzeit dieser Krankheiten beträgt mehrere Jahre

(Fauci, 1988; Pedersen et al., 1989). Es ist bekannt, dass die initiale Virämie während der ersten symptomatischen Phase der Antikörperproduktion vorausgeht, auf die dann ein Abnehmen der Virusreplikation folgt (Ho, et al. 1989). Im Verlaufe der weiteren Erkrankung kommt es zu immunologischen Abnormitäten, die sich unter anderem in einem zunehmenden Verlust an CD4⁺-T-Lymphozyten bemerkbar machen (Ackley et al., 1990; Torten et al., 1991; Becherer et al., 1990; Selwyn et al., 1992). Der Abfall der CD4⁺-Lymphozyten kann bei der HIV-Infektion mit dem Anstieg des Provirusloads (der Anzahl der ins Wirtzellgenom integrierten HIV-Kopien) und einem Anstieg der Virusreplikation (der Anzahl im Plasma vorhandenen viralen RNA-Kopien) korreliert werden (Chevret et al., 1994). Die absolute Quantifizierung der Virusmenge in verschiedenen Körperkompartimenten und im Blut (die sogenannte Virusloadbestimmung) ist deshalb gerade bei diesen Infektionen besonders wichtig. Da sich die FIV-Infektion aufgrund ihrer ähnlichen Pathogenese als Modell für die HIV-Infektion sehr gut eignet, wurde in früheren Studien während experimenteller FIV-Infektionen der Provirus- und RNA-load bestimmt (Torten et al., 1990; Diehl et al., 1995). Diese Studien lieferten Aufschlüsse über die Pathogenese der Erkrankung und deren Brauchbarkeit als Tiermodell. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung einer quantitativen Methode, um den Provirusload in experimentell mit FIV infizierten Katzen während verschiedener Experimente zu bestimmen. Unter anderem sollten die Resultate Erkenntnisse über einen möglichen Effekt von wiederholten Immunstimulationen auf den Verlauf der Erkrankung erbringen und die Prüfung der Wirksamkeit von FIV-Vakzinen ermöglichen.

Die PCR bietet sich wegen ihrer hohen Sensitivität und Schnelligkeit vor allem im Bereich der Diagnostik von Virusinfektionen an. Das Prinzip der PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten macht es jedoch unmöglich, aus der Menge des amplifizierten Produktes direkt Rückschlüsse auf die ursprünglich in der Probe vorhandene DNA-Menge zu ziehen, da sehr kleine Änderungen in der Amplifikationseffizienz zu grossen Mengenunterschieden der synthetisierten DNA führen können. Während der Nukleinsäurereinigung kann es zu kleinen Unterschieden in der Reinheit der DNA und in der Menge von eventuell vorhandenen Inhibitoren der PCR kommen. Dies führt zu kleinen Differenzen zwischen den einzelnen PCR-Reaktionsansätzen, die sich vor allem in den ersten Zyklen der PCR dramatisch auf die Produktmenge nach der Reaktion auswirken.

Um eine Quantifizierung der im Ausgangsmaterial vorhandenen Provirusmenge vornehmen zu können, muss deshalb ein interner, dem Reaktionsgemisch zugegebener Standard, mitamplifiziert werden. Studien, die sich dafür auf sogenannte externe Standards, das heisst, auf einmal hergestellte Verdünnungsreihen als Standardkurven, beziehen, vernachlässigen die zwischen einzelnen Röhrchen auftretenden Unterschiede der Amplifikationseffizienz und können daher nur semiquantitative Resultate erbringen. Interne Standards, bei denen ein Refe-

renztemplate im gleichen Reaktionsansatz mitamplifiziert wird, eignen sich besser für absolute Quantifizierungen. Dies kann zum Beispiel durch gleichzeitige Amplifikation eines zellulären Gens im gleichen Röhrchen geschehen (Kellogg et al., 1990). Die Schwierigkeit bei diesem Ansatz liegt jedoch darin, dass in ihrer Basensequenz unterschiedliche PCR-Templates auch verschiedene thermodynamische Eigenschaften besitzen. Dies führt wiederum zu Unterschieden in der Amplifikationseffizienz und zu unterschiedlichen Produktmengen nach der PCR. Ein interner Standard sollte also in Basensequenz und Länge dem zu amplifizierenden Template möglichst ähnlich sein. Der Ansatz der kompetitiven PCR wird diesem Ziel am ehesten gerecht (Clementi et al., 1993). Das Prinzip dieser Methode besteht in der Koamplifikation zweier ähnlich langer DNA-Stücke mit denselben Primererkennungssequenzen.

Die beiden Sequenzen kompetitieren während der Reaktion um dieselben Primer und Nukleotide. Die Konzentration des Standards vor der Reaktion ist dabei bekannt, und die Mengen der amplifizierten Produkte nach der Reaktion können anhand der Bandenintensitäten direkt verglichen werden. Da die beiden Templates sich in ihrer Länge unterscheiden, sind sie nach der Gelelektrophorese als zwei Banden klar differenzierbar. Da die Effizienz der beiden Reaktionen wegen der Ähnlichkeit der Templates als gleich angesehen wird, kann die Ausgangsmenge der in der Probe vorhandenen DNA nach folgender Formel berechnet werden:

$$WT' = \log WT/Cc \times \log \text{Comp. Vdg.}$$

WT' = Menge des Wildtemplates am Anfang der Reaktion (unbekannte Grösse)

WT = Menge des Wildtemplates am Ende der Reaktion (gemessen an Intensität der Bande nach der Elektrophorese)

Cc = Menge des Kompetitors am Ende der Reaktion (gemessen an Intensität der Bande nach der Elektrophorese)

Comp. Vdg. = Menge des Kompetitors am Anfang der Reaktion (bekannte Konzentration; entspricht der eingesetzten Kompetitorverdünnung)

Da der Kompetitor 81 Basenpaare (bp) kürzer ist als das Wildtemplate, wurde in diesem DNA-Fragment auch entsprechend weniger Ethidiumbromid eingelagert als im Wildtemplate. Deshalb mussten die Werte für den Kompetitor vorerst auf seine Länge korrigiert werden. Die Formel für die Umrechnung lautet:

$$Cc = \text{Wildtemplatelänge in Basenpaaren} / \text{Kompetitorlänge in Basenpaaren} \times \text{Menge des Kompetitors am Ende der Reaktion.}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde wegen der Vorteile, die die kompetitive PCR bietet, dieser Ansatz gewählt, um eine Quantifizierung von FIV-Provirus-DNA zu erreichen.

Tiere, Material und Methoden

Versuchstiere, Blutentnahme und DNA-Extraktion

Die Versuchstiere stammten aus einer SPF (Spezifiziert Pathogen-freien)-Zucht und wurden mit dem Zürich-2-Isolat des FIV infiziert. Die Blutentnahme wurde unter

Allgemeinnarkose an der Vena jugularis vorgenommen. Aus dem heparinisierten Blut wurden mittels Ficoll-Gradienten-Zentrifugation die mononukleären Zellen (periphere blutmononukleäre Zellen, PBMCs) aufgereinigt, in denen sich das FIV-Provirus befindet.

Anschliessend wurde aus diesen Zellen die DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gewonnen. Das Pellet wurde in H₂O gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Qualitative DNA-PCR

2 µg der genomischen DNA wurden in eine qualitative DNA-PCR eingesetzt, um das FIV-Provirus in den infizierten PBMCs nachzuweisen. Für die PCR wurde eine 702 bp lange Sequenz aus dem gag-Segment des FIV ausgewählt, da diese Region unter den FIV-Isolaten stark konserviert ist und sich deshalb besonders für die PCR eignet (siehe Abb. 1). Folgende Primers wurden zur Amplifizierung der sogenannten Wildsequenz ausgesucht:

Primer Z 201

5'-GGCCATTAAACGATGTAGTAATG-3'

Primer Z 202

5'-GCTTGTTGTTCTTGAGTTAATCC-3'

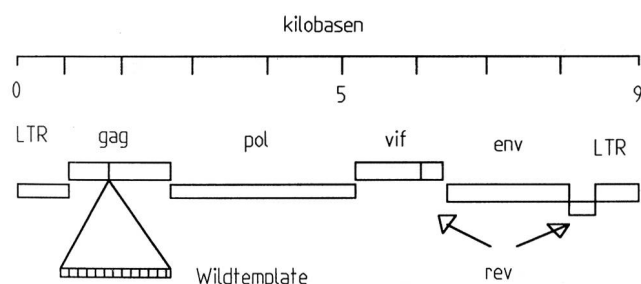


Abbildung 1: Genom von FIV

Das in die Wirtszelle integrierte Genom des FIV besteht aus 9472 bp (Olmsted et al., 1989; Talbott et al., 1989; Maki et al., 1992). Es gehört zu den Retroviren und besitzt die folgenden grundlegenden Gensegmente: Das gag-Gen steht für Gruppen-spezifisches Antigen und kodiert für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. Das pol-Gen kodiert für das pol-Polyprotein und das env-Gen schliesslich kodiert für die Komponenten der Virushülle (*envelope* = Hülle). Ausserdem enthält das FIV-Genom einige regulatorische Sequenzen (LTR für long terminal repeat, vif für viral infectivity factor und rev für regulator of virion protein expression). Die verschiedenen FIV-Isolate unterscheiden sich hauptsächlich in den env-Gensequenzen. Die Homologie zwischen den beiden am weitesten divergierenden FIV-Stämmen beträgt in den Regionen gag, pol und env 87, 84 und 81% (Maki et al., 1992). Das gag-Gen ist also am stärksten konserviert und eignet sich deshalb besonders gut zur Amplifizierung mittels PCR. Das gewählte Wildtemplate hat eine Länge von 702bp und entspricht den Nukleotiden 58-776 des gag-Gens.

Der Primer Z 201 entspricht den Nukleotiden 58-81 in der gag-Sequenz, Primer Z 202 den Nukleotiden 738-776.

Die PCR wurde in einem Ansatz von 20 µl durchgeführt. Im Reaktionsansatz enthalten waren 2 µg genomische DNA aus der Katzenprobe, 2 µl 10 × PCR Reaktionspuffer II (Perkin Elmer, Rotkreuz, Schweiz), 3 mM MgCl₂, 200 µM jedes dNTP's (Catalys, Wallisellen, Schweiz), je 40 pmol der Primer (Microsynth, Balgach, Schweiz) und 0,1 U Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer).

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler (Bioconcept, Allschwil, Schweiz) durchgeführt. 40 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil wurden gefahren: 40 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung), 60 Sekunden bei 53 °C (Annealing) und 60 Sekunden bei 73 °C (Extension).

Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifizierung im 1,8% Agarose-Gel in TAE-Puffer (0,04 M Tris-Azetat, 0,001 M EDTA) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter Anregung auf dem UV-Transilluminator bei 312 nm photographiert.

Quantitative kompetitive PCR

Um den Provirusload in den zuvor qualitativ ausgetesteten Proben zu messen, wurden die Proben einer kompetitiven PCR unterzogen. Das Prinzip bestand darin, dass ein um 81bp verkürztes DNA-Fragment, welches dieselben Primererkennungssequenzen trug, im gleichen Reaktionsansatz während der Reaktion mitamplifiziert wurde.

Herstellung und Klonierung des Kompetitors

Für die Konstruktion des Kompetitors wurde die Methode nach Menzo verwendet (Menzo et al., 1992). Dabei wurde zusätzlich zu den zwei Primern für das Wildtemplate ein dritter Primer (Primer Z 204) konstruiert, der am 5'-Ende die gleiche Sequenz besitzt wie der Primer Z 201, sich dann aber in einer internen Sequenz fortsetzt, und die DNA dadurch während der Amplifikation zwingt, eine Schleife (Loop) von 81 bp zu formen (siehe Abb. 2). Der zusätzliche Primer hatte folgende Basensequenz:

P Z 204:

5'-GCCACCCCAC GGATCC
GGCCATTAAACGATGTAGTA-3'

Anhang Restriktionssite BamHI Primer Z 201

Das Resultat ist ein um 81bp verkürztes DNA-Stück, das dieselben Primererkennungssequenzen wie das Wildtemplate aufweist und deshalb als Kompetitor während der PCR eingesetzt werden kann. Anschliessend an die Konstruktion des Kompetitors wurde das PCR-Fragment in ein Bluescript SK+-Plasmid kloniert (pBluescript SK+; Stratagene, La Jolla CA, USA), um genügende Mengen an Kompetitor-DNA zu erhalten. Dazu wurden neue Primer

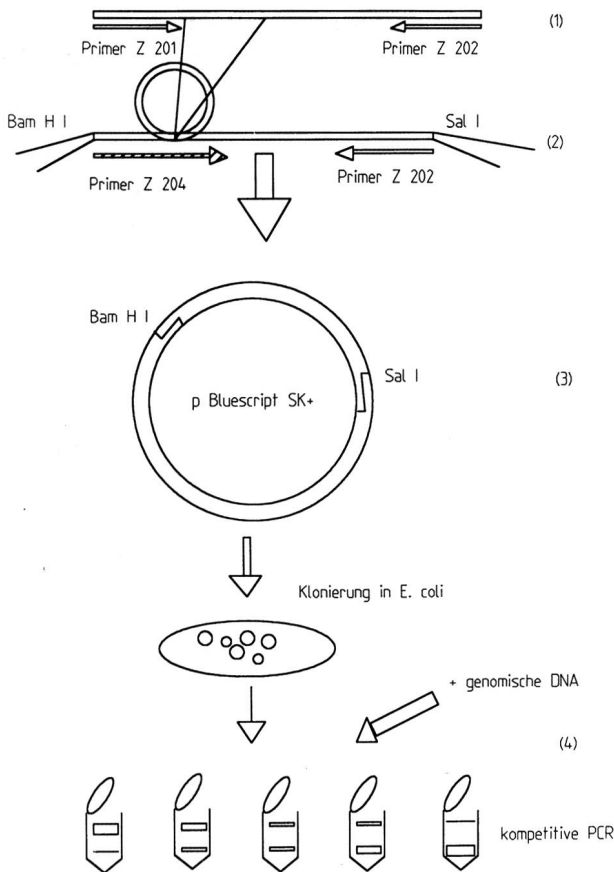


Abbildung 2: Prinzip der Kompetitor-Herstellung
 Das Wildtemplate (1) aus der gag-Sequenz des FIV wurde mit dem Primern Z 201 und Primer Z 202 amplifiziert. Der Kompetitor (2) für die kompetitive PCR wurde mit den Primern Z 204 und Z 202 konstruiert. Der zusätzliche Primer Z 204 besteht anfänglich aus der gleichen Sequenz wie Primer Z 201, überspringt daran anschliessend 81 bp des Wildtemplates und setzt sich dann in einer internen Sequenz fort. Dadurch wird die DNA während der Amplifizierungsreaktion gezwungen, eine Schleife von 81 bp zu formen. Das Resultat ist der verkürzte Kompetitor, der immer noch die gleichen Primerbindungsstellen enthält. Der Kompetitor wurde anschliessend mit Hilfe der neu eingeführten Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI in einen pBluescript-Vektor kloniert (pKA 101) (3), damit er in genügender Menge hergestellt und in der kompetitiven PCR eingesetzt werden konnte (4). Die amplifizierten Banden nach der Agarosegel-Elektrophorese sind schematisch in den Röhren dargestellt. Die oberen Banden stellen das Wildtemplate dar, die unteren Banden den Kompetitor.

hergestellt (Microsynth). Der Primer Z 204 enthielt die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI und der Primer Z 202 die Erkennungssequenz für das Enzym SalI (siehe Abb. 2). Der neue Primer Z 202 hatte folgende Basensequenz:

Primer Z 202:
 5'-GCCACCCCAC GTCGAC
 GCTTGTGTTCTTGAGTTAATCC-3'
 Anhang Restriktionssite *Sal*I Primer Z 202

Amplifizierungsreaktion

Die Bedingungen für die kompetitive PCR waren gleich wie diejenige für die qualitative PCR (siehe oben). In jeweils sechs Reaktionansätze pro Katzenprobe wurde zusätzlich zu den 2 µg genomische DNA eine zunehmende Menge Kompetitor-Moleküle pipettiert. Die Konkurrentkonzentrationen betragen 10^5 , 10^4 , 5×10^3 , 10^3 , 5×10^2 und 10^2 Kopien / Reaktionsansatz.

Nach der Reaktion wurden die Banden auf einem 1,8% Agarosegel aufgetrennt und danach mittels Densitometrie (MWG-Biotech, Münchenstein, Schweiz) die Bandenintensitäten integriert. Die Berechnung der Proviruskopienzahl wurde auf einem Statistikprogramm (Statview, Macintosh) durchgeführt. Dazu wurden die Konkurrent-

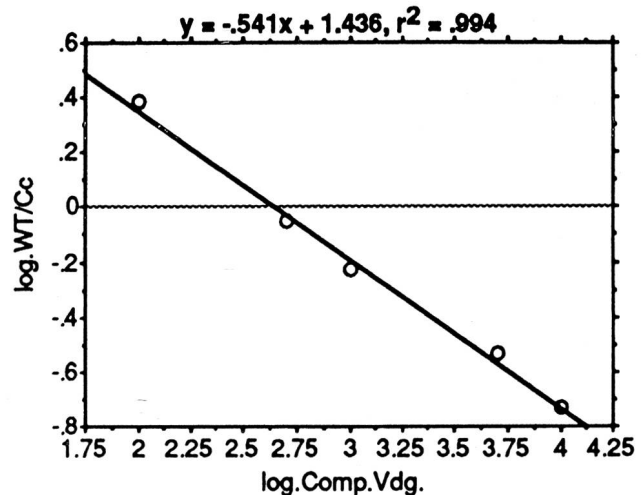


Abbildung 3: Berechnung der Proviruskopienzahl
 Die Berechnung der Proviruskopienzahl wurde mit einem Statistikprogramm durchgeführt. Dazu wurden die Konkurrentverdünnung (x-Achse, logarithmisch) gegen den Quotienten WT/Cc (y-Achse, logarithmisch) aufgetragen. Der Äquivalenzpunkt, an dem die Kopienzahl des Wildtemplates gleich derjenigen des Konkurrents ist, konnte anschliessend aus der von der Software erstellten Regressionsgerade durch die als Punkte aufgetragenen Werte berechnet werden (siehe Abb. 3). Die absolute Proviruskopienzahl erhält man durch Auflösen der Gleichung der Geraden nach $y = 0$. Bei dieser Katze betrug die Proviruskopienzahl in der 7. Woche nach experimenteller FIV-Infektion 1500 Kopien / Million PBMCs.

$\log.WT/Cc$: Logarithmus des Quotienten der Bandenintensitäten des Wildtemplates (WT) und des korrigierten Konkurrentwertes (Cc).

$\log.Comp.Vdg.$ = Logarithmus der eingesetzten Konkurrentverdünnungen.

r^2 = Regressionskoeffizient.

verdünnung (x-Achse, logarithmisch) gegen den Quotienten der Wildtemplate-Bande / Kompetitor-Bande (y-Achse, logarithmisch) aufgetragen. Der Äquivalenzpunkt, an dem die Kopienzahl des Wildtemplates gleich derjenigen des Kompetitors ist, konnte anschliessend aus der von der Software erstellten Gerade berechnet werden (Abb. 3).

Resultate

Sensitivität

Die Sensitivität der PCR mit der Kompetitor-DNA betrug 10^1 Kopien (Abb. 4). Dies muss als sehr gut angesehen werden, da die Sensitivitätsgrenze für PCR-Anwendungen im allgemeinen bei 100–1000 Kopien liegt.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde mit DNA einer Katze 7 Wochen nach der Infektion ermittelt. Nach fünfmaligem Austesten der Probe ergab sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit (Standardabweichung/Mittelwert $\times 100 =$ Variationskoeffizient $V_k = 1,55\%$). Die Reproduzierbarkeit von routinemässig in Labors der klinischen Chemie angewendeten Tests liegt in der Grössenordnung von 2%.

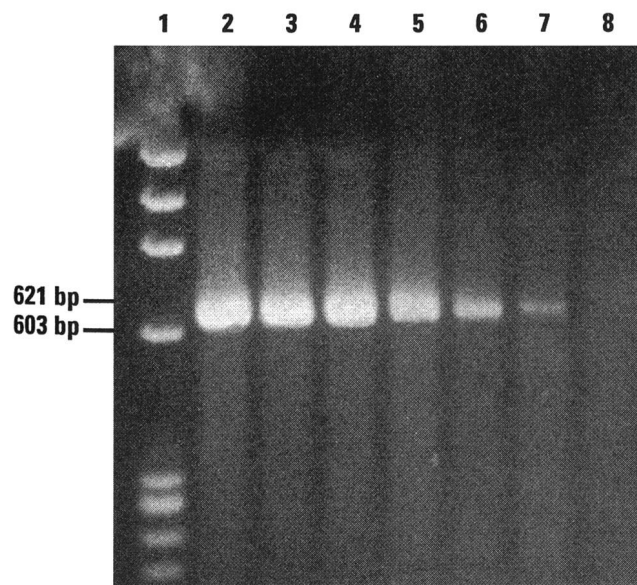


Abbildung 4: Sensitivitätsprüfung
Die Sensitivitätsprüfung der PCR mit der Kompetitor-DNA ergab eine Nachweisgrenze von 10 Kopien. Lane 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker $\Phi X 174 / Hae III$. In den Lanes 2–8 wurden verschiedene Verdünnungen des Kompetitors (621 bp) geladen. Lane 2: 10^6 , Lane 3: 10^5 , Lane 4: 10^4 , Lane 5: 10^3 , Lane 6: 10^2 , Lane 7: 10^1 , Lane 8: 10^0 Kopien.

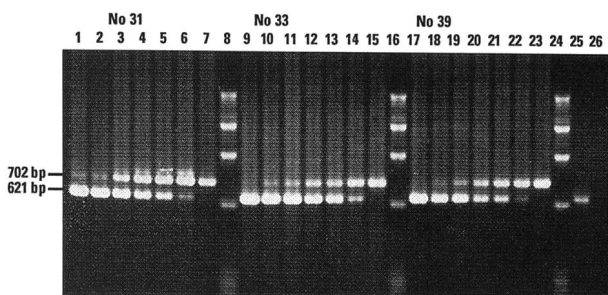


Abbildung 5: Beispiel von drei kompetitiven PCR's
Kompetitive PCR-Assays von drei Katzen 7 Wochen nach der Infektion.

Als Molekulargewichtsmarker wurde $\Phi X 174 / Hae III$ verwendet (Lane 8, 16, 24).

Lane 1–6, 9–14, 17–22: Je 2 μg genomische DNA (702 bp) der entsprechenden Katze zusammen mit 10^5 , 10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 10^2 Kompetitor-Kopien (621 bp).

Als Positivkontrollen wurden 10^2 Kompetitor-Kopien eingesetzt (Lane 25), während H_2O als Negativkontrolle diente (Lane 26).

Die berechnete Proviruskopienzahl lag für die Katze No. 31 bei 6600, für die Katze No. 33 bei 600 und für die Katze No. 39 bei 4400 Kopien / Million PBMC's.

Provirusload

Der Provirusload wurde bei 20 DNA-Proben von Katzen 7 bis 25 Wochen nach der Infektion bestimmt. Drei Beispiele einer kompetitiven PCR mit Katzen-DNA sind aus der Abbildung 5 ersichtlich.

Der Provirusload lag für Katzen in der symptomatischen Phase der Infektion (den ersten drei Monaten der Infektion) zwischen 199 und 22 000 Proviruskopien / Million PBMCs.

Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer Methode zur Quantifizierung des Provirusloads in FIV-infizierten Katzen. Noch vor kurzem wurde der Provirusload dadurch bestimmt, dass infizierte Lymphozyten in abnehmender Konzentration mit «kalten», nicht infizierten Lymphozyten gemischt wurden. Anschliessend wurde die DNA der Zellen der verschiedenen Verdünnungsstufen extrahiert und einer qualitativen PCR unterzogen. Diese Methode war nicht nur sehr arbeitsaufwendig, sie erlaubte auch nur eine ungenaue Bestimmung der Zahl der Provirus-Kopien pro Zahl der Lymphozyten. Im Gegensatz dazu erwies sich die in dieser Arbeit beschriebene Methode als sehr genau. Die Werte können als absolute Zahlen innerhalb der Sensitivität des Assays interpretiert werden und ergeben deshalb gegenüber semiquantitativen PCR-Methoden entscheidende Vorteile. Die Methode kann als sehr sensitiv und gut reproduzierbar eingestuft werden.

Der Nachteil der Methode ist der relativ grosse Arbeits- und Kostenaufwand für die Quantifizierung, da für jede Probe sechs PCR-Ansätze pipettiert werden, um ein interpretierbares Resultat zu erhalten.

Ein Problem, das während der Etablierung der Methode auftrat, war das unterschiedliche Temperaturoptimum für das Wildtemplate und den Kompetitor. Obwohl beide DNA-Sequenzen dieselben Primererkennungssequenzen tragen, und deshalb auch dieselbe Annealingtemperatur angewendet wird, waren die beiden Reaktionen bei 53 °C nicht gleich sensitiv. Das könnte auf die unterschiedliche Sekundärstruktur von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA zurückzuführen sein, die sich in unterschiedlichen thermodynamischen Eigenschaften der beiden Templates auswirkt. Für die *Taq*-Polymerase wird dadurch die genomische DNA schwieriger zugänglich als die Plasmid-DNA, was in unterschiedlicher Effizienz der beiden Reaktionen resultiert. Um dieses Problem zu lösen, musste das Plasmid, das den Kompetitor enthielt, zuerst linearisiert werden, d.h. mittels eines Restriktionsenzym einmal geschnitten werden.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich mit der Reproduzierbarkeit der PCR-Resultate des Kompetitors. Die Verdünnung 10^1 Kopien/ μ l war nicht immer als Bande auf dem Agarosegel sichtbar. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem den Kompetitorverdünnungen Kalbthymus-DNA zugegeben wurde. Diese DNA enthält keine retroviralen Sequenzen und wirkte als sogenannte Carrier-DNA. Der Effekt könnte damit erklärt werden, dass durch die Zugabe von 3 μ g Kalbthymus-DNA zu je 100 μ l der Plasmidverdünnungen die Möglichkeit verringert wird, dass Kompetitormoleküle an der Röhrchenwand festkleben und zu Pipettierungenauigkeiten führen.

Die berechnete Proviruskopienzahl während der Primärphase der experimentellen FIV-Infektion liegt im Bereich derjenigen für HIV in dieser Krankheitsphase ermittelten Werte (Dickover et al., 1994). Die grosse Schwankungsbreite zwischen den Werten konnte auch bei Patienten, die mit dem HIV infiziert sind, beobachtet werden. Weitere Untersuchungen werden es uns ermöglichen, die Fragestellungen bezüglich des Einflusses von Immunstimulationen und experimentellen Vakzinen auf den Provirusload von FIV-infizierten Katzen zu beantworten.

Literatur

- Ackley C.D., Yamamoto Y.K., Levy N., Pedersen N.C., Cooper M.D. (1990): Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 64, 5652-5655.
- Becherer P.R., Smiley M.L., Matthews T.J., Weinhold K., Mc Millan C.W., White G.C. (1990): Human immunodeficiency virus-1 disease progression in hemophiliacs. *Am. J. Hematol.* 34, 204-209.
- Chevret S., Kirstetter M., Mariotti M., Lefrère E., Frottier J., Lefrère J.-J. (1994): Provirus copy number to predict disease progression in

asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 169, 882-885.

Clementi M., Menzo S., Bagnarelli P., Manzin A., Valenza A., Varaldo P.E. (1993): Quantitative PCR and RT-PCR in Virology. *PCR Meth. Appl.* 2, 191-196.

Dickover R.E., Dillon M., Gillette S.G., Deveikis A., Keller M., Plaeger-Marshall S., Chen I., Diagne A., Stiehm E.R., Bryson Y. (1994): Rapid increases in load of human immunodeficiency virus correlate with early disease progression and loss of CD4-cells in vertically infected infants. *J. Infect. Dis.* 170, 1279-1287.

Diebl L.J., Mathiason-Dubard C.K., O'Neil L.L., Hoover E.A. (1995): Longitudinal assessment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a competitive reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* 69, 2328-2332.

Fauci A.S. (1988): The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239, 617-622.

Ho D.D., Moudgh T., Alam M. (1989): Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* 321, 1621-1625.

Kellogg D.E., Sninsky J.J., Kwok S. (1990): Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 189, 202-208.

Maki N., Myazawa T., Fukasawa M., Hasegawa A., Hayami M., Miki K., Mikami T. (1992): Molecular characterization and heterogeneity of feline immunodeficiency virus isolates. *Arch. Virol.* 123, 29-45.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.

Menzo S., Bagnarelli P., Giacca M., Manzin A., Varaldo P.E., Clementi M. (1992): Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1752-1757.

Olmsted R.A., Barnes A.K., Yamamoto J.K., Hirsch V.M., Purcell R.H., Johnson P.R. (1989): Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2448-2452.

Pedersen N.C., Yamamoto J.K., Ishida T., Hansen H. (1989): Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopath.* 21, 111-119.

Selwyn P.A., Alcibes P., Hartel D., Buono D., Schönbaum E.E., Klein R.S., Davenport K., Friedland H. (1992): Clinical manifestations and predictors of disease progression in drug users with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 327, 1697-1703.

Talbott R.L., Sparger E.E., Lovelace K.M., Fitch W.M., Pedersen N.C., Luciw P.A., Elder J.H. (1989): Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5743-5747.

Torten M., Franchini M., Barlough J.E., George J.W., Mozes E., Lutz H., Pedersen N.C. (1991): Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 5, 2225-2230.

Torten M., Sparger E.E., Rideout B.A., Pedersen N.C., Luciw P.A. (1990): Coinfection of cats with FIV and FeLV affects both quantity and distribution of FIV DNA in various tissues. *Vaccines* 90, 375-378.

Dank

Dieses Projekt wurde verdankenswerterweise unterstützt durch die Schweizerische Bankgesellschaft im Auftrag eines Kunden.

Korrespondenzadresse: K. Allenspach, Veterinär-Medizinisches Labor, Departement für Innere Veterinärmedizin, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich.