

**Evolutionsdynamik des *pol*-Gens bei HIV-1 infizierten
Patienten unter geänderten selektiven Druck**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Melanie Balduin

aus Rheinbach

Hundt Druck, Köln

2008

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Pfister

Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Roth

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Karin Schnetz

Beisitzer: Dr. rer. nat. Rolf Kaiser

Tag der Disputation: 03. Juli 2008

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Das Humane Immundefizienz Virus (HIV).....</i>	1
1.2	<i>HIV-1 Viruspartikel und Genomaufbau</i>	2
1.3	<i>Genomaufbau und HIV-1-Proteine</i>	3
1.3.1	<i>Das gag-Gen und die Gag-Proteine</i>	3
1.3.2	<i>Das pol-Gen und dessen Genprodukte</i>	4
1.3.3	<i>Das env-Gen und die akzessorischen Gene</i>	5
1.4	<i>Replikationszyklus des HIV.....</i>	6
1.5	<i>Pathogenese und Infektionsverlauf bei HIV-1.....</i>	7
1.5.1	<i>Pathogenese.....</i>	7
1.5.2	<i>Infektionsverlauf</i>	8
1.6	<i>Antiretrovirale Therapie.....</i>	10
1.7	<i>Resistenzentwicklung.....</i>	12
1.8	<i>Resistenzbestimmung.....</i>	13
1.8.1	<i>Phänotypische Resistenztestung</i>	13
1.8.2	<i>Genotypische Resistenztestung</i>	13
1.8.3	<i>Einsatz der Resistenzuntersuchungen</i>	14
1.9	<i>Therapiepausen.....</i>	14
1.10	<i>Nachweis von Minderheitenpopulationen</i>	16
1.11	<i>Ziel der Arbeit:.....</i>	17
2	Material und Patienten.....	18
2.1	<i>Material.....</i>	18
2.1.1	<i>Bakterienstamm</i>	18
2.1.2	<i>Nukleinsäuren</i>	18
2.1.3	<i>Enzyme und Enzyminhibitoren</i>	20
2.1.4	<i>Reagenziensysteme</i>	21
2.1.5	<i>Lösungen, Puffer und sonstige Chemikalien</i>	21
2.1.6	<i>Medien.....</i>	22
2.1.7	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	23
2.1.8	<i>Software zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten.....</i>	24
2.1.9	<i>Datenbanken:</i>	24
2.2	<i>Patienten</i>	24
2.2.1	<i>Patientenkollektiv 1: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“, „in“ und „nach“ einer Therapiepause</i>	24
2.2.2	<i>Patientenkollektiv 2: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“ und „in“ einer Therapiepause</i>	25
2.2.3	<i>Patientenkollektiv 3: Seren therapienaiver HIV-1 infizierter Patienten</i>	25
3	Methoden.....	27
2.2.4	<i>Weitere Patientenproben</i>	26
3.1	<i>Isolierung viraler RNA HIV infizierter Patienten.....</i>	27
3.1.1	<i>Abtrennung der Zellbestandteile von EDTA- Blut.....</i>	27
3.1.2	<i>Prinzip der HIV-RNA Isolierung</i>	27
3.2	<i>Reverse Transkription</i>	27
3.3	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	27
3.3.1	<i>„Hot start“ PCR</i>	28
3.3.2	<i>„Nested“ PCR.....</i>	28
3.3.3	<i>„Touch down“ PCR</i>	28
3.3.4	<i>„One Step“ RT-PCR.....</i>	29

3.4	Amplifikation des Protease- und Reverse Transkriptase- kodieren Gens pol von HIV-1	29
3.4.1	„One Step“ RT-PCR und „Nested“ PCR (Standardmethode, „in house“-System)	29
3.5	HIV Genotyping Kit (RT-PCR; kommerzielle Methode)	31
3.6	Sequenzierung	32
3.6.1	Sanger-Methode der DNA Sequenzierung	32
3.6.2	Sequenzreaktion	33
3.7	Aufreinigung der Sequenzprodukte	34
3.8	Sequenzierung	35
3.9	Sequenz-Analyse	36
3.9.1	Sequenzbearbeitung	36
3.9.2	Sequenzinterpretation	36
3.10	DNA-Standardmethoden	37
3.11	Bakterienkultur und -Methoden	37
3.11.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	37
3.11.2	Transformation kompetenter Bakterien	37
3.11.3	Langzeitlagerung von Bakterien	38
3.11.4	Kulturen zur Plasmidisolierung	38
3.11.5	Plasmidpräparationen	38
3.11.6	Kolonie-PCR zur Kontrolle des Inserts	38
3.12	Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR	39
3.13	Herstellung eines Plasmids mit integrierter Wildtyp Protease und Reverser Transkriptase	39
3.14	In vitro Mutagenese	40
3.15	Minderheitendetektion mittels Echtzeit-PCR	41
3.15.1	SYBR-Green	42
3.15.2	TaqMan-Sonden	42
3.15.3	Hybridisierungs-Sonden	42
3.15.4	Quantifizierung der Standardplasmide	43
3.15.5	Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT	44
3.15.6	Detektion von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103	45
3.15.7	Detektion von Minderheitenpopulationen in der Protease	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Detektion resistenzassoziierter Mutationen durch Direktsequenzierung	49
4.1.1	Amplifikation und Sequenzierung der Protease und der Reversen Transkriptase des pol- Gens von HIV-1	49
4.1.2	Evolution von Virusvarianten unter geändertem selektiven Druck in einer Therapiepause	51
4.1.3	Evolution von Virusstämmen stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten vor und in einer Therapiepause (Patientenkollektiv 2)	64
4.2	Minderheitendetektion mittels Echtzeit PCR	74
4.2.1	Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR	74
4.2.2	Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT	75
4.2.3	Nachweis und Analyse von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103 (Patientenkollektiv 3)	82
4.2.4	Analyse und Auswirkungen von Minderheitenpopulationen an Position V82A der Protease	89
5	Diskussion	91
5.1	Therapiepause	91

Inhaltsverzeichnis

5.2	<i>Minoritätendetektion</i>	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Abkürzungen	111
8	Zusammenfassung	114
9	Abstract	115
10	Danksagung.....	116
11	Erklärung	117
12	Lebenslauf	118
13	Anhang.....	119

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (*human immunodeficiency virus*, HIV-1) wurde 1983 als Erreger des erworbenen Immundefizienz-Syndroms (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) identifiziert (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984; Popovic et al., 1984). HIV gehört zur Familie der *Retroviridae*, welche ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrangorientierung besitzen. Die gesamte Familie der *Retroviridae* zeichnet sich durch das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) aus, welches Retroviren dazu befähigt, entgegen dem üblichen Informationsfluss in einer Zelle (von DNA über RNA zum Protein) die eigene virale RNA zunächst in DNA umzuschreiben. Diese doppelsträngige DNA-Zwischenstufe kann ins Wirtsgenom als Provirus integrieren. Die *Retroviridae* gliedern sich in zwei Unterfamilien, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumaretrovirinae*. Die *Orthoretrovirinae* umfassen die Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und Lentiviren während die einzige Gattung der *Spumaretrovirinae* die Spumaviren sind. HIV lässt sich den Lentiviren zuordnen. Die Besonderheit der Lentiviren gegenüber den anderen Retroviren ist die Reifung des Viruspartikels durch die virale Protease nach dem Abschnürungsprozess.

Aufgrund von Sequenzunterschieden kann HIV-1 in die drei Hauptgruppen M (*main group*), O (*outliner*) und N (*non-M/non-O*) eingeteilt werden, wobei die Hauptgruppe M noch einmal in elf Subtypen A bis K unterteilt wird (Louwagie et al., 1993; Grez et al., 1994; Gurtler et al., 1996). Zusätzlich treten diese beschriebenen Subtypen in mindestens 16 rekombinanten Formen, sogenannten „*circulating recombinant forms*“ oder CRF01-CRF16 auf. Die Isolate dieser Subtypen sind global verbreitet, wobei in Europa und Nordamerika hauptsächlich Isolate des Subtyps B, in Afrika hauptsächlich Isolate der Subtypen A und C, aber auch alle anderen vorkommen (Stebbing et al., 2003; Wainberg, 2004). 1986 konnte ein zweiter HIV-Typ (HIV-2), der nur etwa 45-50% Sequenzhomologie zu HIV-1 aufwies, aus einem afrikanischen Patienten isoliert werden (Clavel et al., 1987). Dieser Typ ist im Westen des afrikanischen Kontinents und in Indien endemisch verbreitet (Gao et al., 1994; Norrgren et al., 1997). Auch die Sequenzen der verschiedenen HIV-2-Isolate weisen große Unterschiede auf und werden deshalb in sechs Subtypen (A-F) eingeteilt.

1.2 HIV-1 Viruspartikel und Genomaufbau

Das HI-Virion (Abb. 1) hat einen Durchmesser von ca. 100 nm und ist von einer Hüllmembran umgeben, die sich von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet (Gelderblom et al., 1987). Assoziiert mit dieser Membran sind etwa 70 *Spikes*, die von je drei Heterodimeren der viralen Glykoproteine gp41 und gp120 gebildet werden. Im Inneren des Viruspartikels wird im reifen Zustand ein konisches Kapsid aus dem Kern- oder Core-Protein p24 gebildet. Eingebettet ist diese Corestruktur in einem Netz aus dem Matrixprotein p17, welches über Myristinsäurereste in der Hüllmembran des Virions verankert ist.

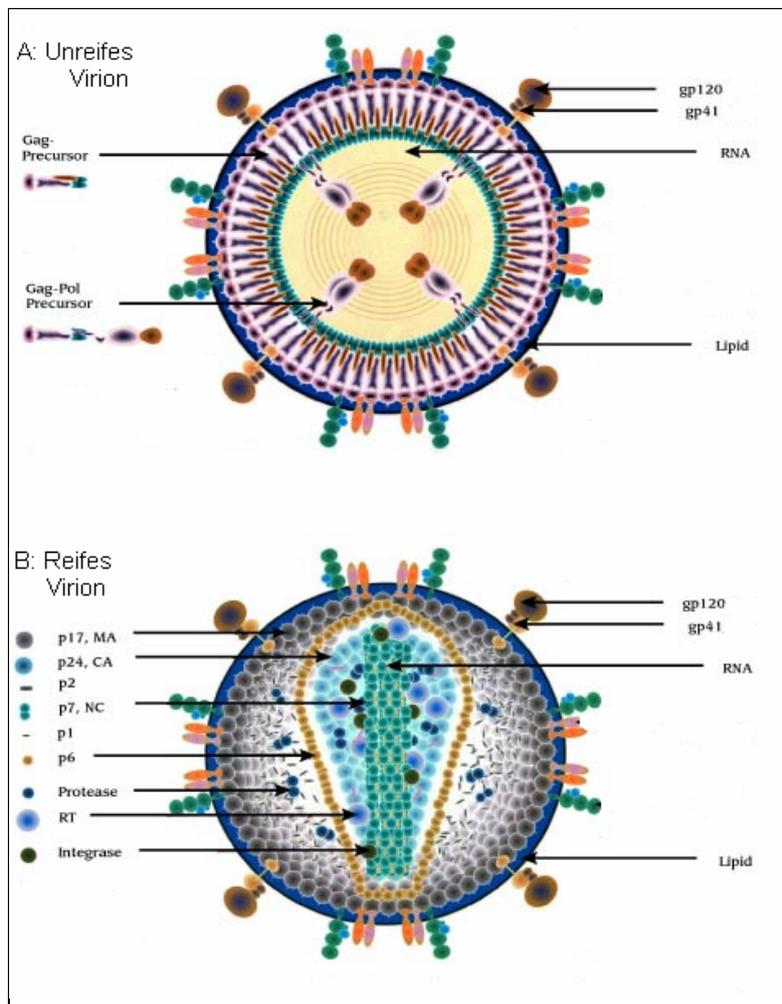


Abb. 1: Unreifes und reifes HIV-1 Virion

A: Unreifes Virion: Schematische Darstellung von Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen, den Oberflächen-Glykoproteinen gp120 und gp41, der Lipiddoppelmembran und der RNA. **B:** Das reife Virion: Mit gag- und pol-Proteinen in ihren prozessierten Formen, den env-Proteinen gp120 und gp41 und der komplexierten RNA (nach Henderson und Arthur).

Das Kapsid ist durch das p6-Protein direkt mit der Hüllmembran verknüpft (Gelderblom et al., 1987). Im Inneren des Kapsids befindet sich das Genom, das aus zwei identischen 9,2 kb großen plusstrangorientierten RNA-Molekülen gebildet wird, die durch eine Dimerisierungsstelle miteinander verbunden (Paillart et al., 1996; Frankel et al., 1998) und

mit dem Nukleokapsidprotein p7/p9 komplexiert sind. Außerdem befinden sich im Core die RT, die virale Protease (PR), die Integrase (IN) und das akzessorische Protein *vpr* (*viral protein rapid*).

1.3 Genomaufbau und HIV-1-Proteine

Das HIV-Genom ähnelt mit seiner 5'-Cap-Struktur und 3'-Polyadenylierung einer eukaryontischen mRNA und enthält 9 offene Leseraster (*open reading frames*, ORF, Abb. 2). Drei dieser Leseraster kodieren für die Proteine *gag* (*group specific antigene*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*). Es handelt sich hierbei um Polyproteine, die proteolytisch in Einzelproteine gespalten werden.

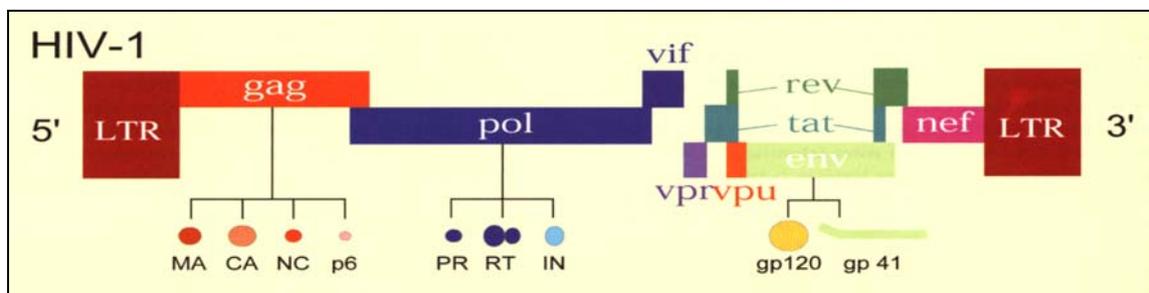


Abb. 2: Genomstruktur des integrierten HIV-1 Provirus

Die Gene *gag*, *pol* und *env* sind für alle Retroviren charakteristisch. *Gag* kodiert für das Matrixprotein (MA), das Kapsidprotein (CA), das Nukleoprotein (NC) und das p6-Protein. *Pol* kodiert für die Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN) und der *Env*-Bereich für die Glykoproteine gp120 und gp 41. Die Regionen *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* und *nef* kodieren für akzessorische Proteine (verändert nach (Fackler O, 2002)).

1.3.1 Das *gag*-Gen und die Gag-Proteine

Die *gag*-Genregion kodiert für die Proteine p17 (Matrixprotein), p24 (Kapsidprotein), p7 (Nukleoprotein), p6-Gag sowie die beiden *Spacerpeptide* p2 und p1. Zunächst werden all diese Proteine als gemeinsames Vorläuferprodukt synthetisiert (55 kDa), dann an die Zellmembran rekrutiert und erst im bereits abgeschnürten Virion kommt es zur Reifung durch die Protease, die die einzelnen Komponenten abspaltet und so aktive Proteine entstehen lässt. Die proteolytische Spaltung des Gag-Vorläuferproteins induziert eine Umstrukturierung des Virions zum reifen, infektiösen Viruspartikel (Bryant et al., 1990).

Zu den Aufgaben des Gag-Vorläuferproteins gehört die Assemblierung der viralen Moleküle an der Zellmembran, während die reifen Gag-Proteine nach der Abschnürung des Virus für die Entfaltung und Disassemblierung, die sogenannte Neustrukturierung, zuständig sind (Freed, 1998, 2001).

1.3.2 Das *pol*-Gen und dessen Genprodukte

Das *pol*-Gen wird als Gag/Pol-Vorläuferprotein exprimiert. Bei dem Gag/Pol-Vorläuferprotein handelt es sich um ein Fusionsprotein aus dem aminoterminalen Gag-Protein und der sich daran anschließenden Pol-Domäne. Dieses Fusionsprotein entsteht durch eine Leserasterverschiebung während der Translation. Dies geschieht in ca. 5% der Translationsvorgänge, wodurch die Menge an Enzymen kontrolliert und limitiert wird. In den übrigen 95% der Translationsvorgänge entstehen Gag-Polypeptide. Das Gag/Pol-Vorläuferprotein besteht aus Gag-Polypeptiden, einer darauf folgenden Proteasedomäne, der daran anschließenden RT und der Integrase. Durch Myristylierung liegt dieses Vorläuferprodukt innen an der Zytoplasmamembran verankert vor. Nachdem sich die viralen Partikel abgeschnürt haben, werden die einzelnen Proteine durch die Protease gespalten.

1.3.2.1 Protease

Die Protease von HIV-1 gehört zu den Asparaginproteasen und wird aus einem Homodimer mit zwei 99-Aminosäuren (11 kD) großen Untereinheiten gebildet. Ihre Funktion ist die proteolytische Spaltung der viralen Vorläuferproteine. Ihre Aktivität ist essentiell für die Reifung der Viruspartikel (von der Helm, 1996). Die unvollständige Proteolyse und eine Überexpression der Protease führen zu unreifen oder nicht infektiösen Partikeln (Peng et al., 1989). Da die Protease aus dem Gag/Pol-Vorläuferprotein durch Autoproteolyse hervorgeht, ist die Effizienz des Enzyms zum einen von der Konzentration dieses Vorläuferproteins und zum anderen von dem Ausmaß der Autoproteolyse abhängig.

1.3.2.2 Reverse Transkriptase und Ribonuklease H

Die RT ist eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreibt. Sie ist ein Heterodimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 66 kDa und 51 kDa. Die 66 kDa Untereinheit weist zusätzlich zu der Polymeraseaktivität noch eine Ribonuklease H (RNaseH)-Domäne auf, die die RNA in einem intermediären DNA-RNA-Hybrid hydrolysiert. Die RNaseH-Aktivität lässt sich im carboxyterminalen Bereich der größeren Untereinheit lokalisieren, die Polymerasefunktion befindet sich im aminoterminalen Bereich.

Da der RT aufgrund einer fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturlesefunktion fehlt, kommt es mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} Basen zu einem Einbau eines nicht komplementären Nukleotids. Dies ist die Hauptursache für die hohe Mutationsrate von HIV, die zu einer gesteigerten Populationsdynamik und zur gleichzeitigen Existenz von mehreren Viruspopulationen (Quasispezies) bei einem Wirt führt (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995).

1.3.2.3 Integrase

Die Integrase ist eine Nukleotidyltransferase, die vom *pol*-Gen kodiert wird. Sie hat ein Molekulargewicht von 32 kDa und agiert sowohl als Endonuklease, als auch als Ligase. Sie schneidet doppelsträngige DNA an bestimmten Basenfolgen und katalysiert somit den Einbau des viralen Genoms (Provirus) in das Wirtszellgenom (Fields, 1996).

1.3.3 Das *env*-Gen und die akzessorischen Gene

Das *env*-Gen kodiert für die Glykoproteine gp120 und gp41, die zusammen die *Spikes* an der Oberfläche des Virions bilden. Zudem besitzt das HIV-1 Genom noch mindestens sechs akzessorische Gene *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* und *vpu*, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen und hauptsächlich regulatorische Funktionen haben. *Tat* (**t**rans-**a**ctivator of **t**ranscription) aktiviert die Transkription, *nef* (**n**egative **r**egulatory **f**actor) reguliert unter anderem die CD4- und MHC-Klasse-I-Antigene auf der Oberfläche der infizierten Zellen herunter. *Vpr* (**v**iral **p**rotein **r**) ist am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt und kann in hohen Konzentrationen Apoptose induzieren (Heinzinger et al., 1994). *Rev* (**r**egulator of **v**irion protein expression) reguliert durch die Bindung an die mRNA der Strukturproteine das Verhältnis von Struktur- zu regulatorischen Proteinen und *vpu* (**v**iral **p**rotein **u**nique) erhöht die Rate der Virusausschleusung und verringert die Anzahl der CD4-Rezeptoren auf der infizierten Zelle. *Vif* (**v**irion **i**nfectivity **f**actor) ist essentiell für die Infektion *in vivo*. Durch *vif* wird in der späten Phase der Virusproduktion die angeborene Immunantwort von T-Zellen und Makrophagen unterbunden. Ohne *vif* ist HIV in humanen T-Zellen nicht mehr infektiös (Frankel, and Young, 1998).

1.4 Replikationszyklus des HIV

Der Replikationszyklus des HIV umfasst mehrere Abschnitte, die sich wie in Abb. 3 zu sehen, unterteilen lassen.

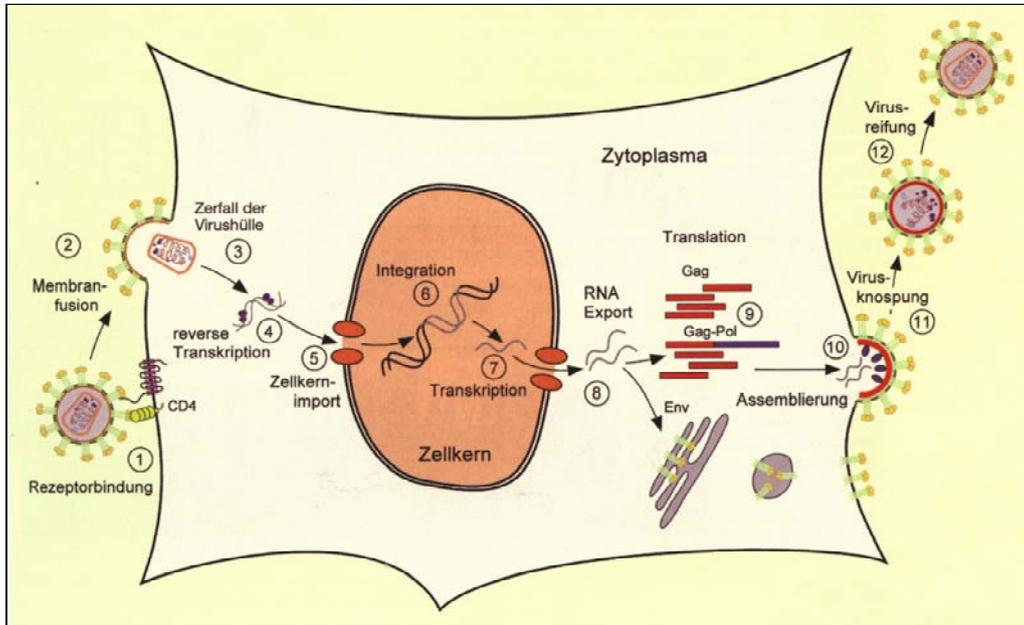


Abb. 3: Replikationszyklus von HIV (verändert nach Fackler O, 2002)

①, ② Adsorption und Penetration:

Die Bindung von gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die Bindung des Virus an einen Korezeptor (CCR5 oder CXCR4) ermöglicht wird. Sobald dieser Korezeptor ebenfalls gebunden wird, kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung, wodurch das Transmembranprotein gp41 über eine Fusionsdomäne mit der Zellmembran in Kontakt tritt (Kowalski et al., 1987). Es folgt eine Verschmelzung der Membranen und das Kapsid kann in das Zytoplasma entlassen werden (Freed, 2001). CD4-Rezeptoren, die einen der Hauptrezeptoren zum Eintritt von HIV darstellen, sind auf der Oberfläche von CD4⁺-T-Lymphozyten (T-Helferzellen), Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen lokalisiert.

④, ⑤ Reverse Transkription:

Bei der Reversen Transkription werden die beiden identischen RNA-Moleküle in eine lineare, doppelsträngige DNA umgeschrieben (Telesnitsky A, 1997). Diese provirale DNA wird an beiden Seiten durch *Long Terminal Repeats* (LTR) flankiert (Peliska et al., 1992). Assoziiert mit p17, RT, IN, *vpr* und zusätzlichen zellulären Proteinen wird die DNA als Präintegrationskomplex (PIK) in den Zellkern transportiert.

⑥ Integration:

Durch die Integrase wird die provirale DNA im Zellkern an willkürlicher Stelle in das Wirtsgenom eingebaut (Goff, 1992; Whitcomb et al., 1992). Das integrierte Provirus kann nun in eine Phase genetischer Latenz eintreten oder die Replikation beginnen.

⑦, ⑧, ⑨ Transkription und Translation:

Die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Bei der Transkription entsteht ein mehrfach gespleißtes mRNA Molekül, das für die Proteine Tat, Rev und Nef kodiert (Muesing et al., 1985), eine einfach gespleißte mRNA, die für Env, Vif, Vpu und Vpr kodiert, und eine ungespleißte Form, von der Gag und Gag/Pol-Proteine translatiert werden. Die ungespleißte RNA dient alternativ auch als neues virales RNA-Genom. Die mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und dort translatiert.

⑩, ⑪ Anlagerung und Abknospung:

Die Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden mit Hilfe von zellulären Faktoren an die Zellmembran transportiert. Hier interagieren sie mit den ebenfalls auf der Oberfläche vorhandenen Glykoproteinen. Die Zytoplasmamembran beginnt sich in Membranbereiche mit einer besonders hohen Konzentration von gp120 und gp41 auszustülpfen und unreife Viruspartikel mit Gag und RNA abzuschnüren („*budding*“).

⑫ Reifung:

Nach Abschnürung des Virions kommt es in einem leicht sauren Milieu (pH 6) in einem autokatalytischen Schritt zur Abspaltung und Dimerisierung der Protease aus dem Vorläuferprotein. Nur so ist es möglich, dass eine korrekte Morphogenese, Assemblierung der Proteine und RNA-Genome im Virion, stattfindet. Würde die Protease früher aktiv, käme es zu nicht infektiösen Viruspartikeln (Karacostas et al., 1993). Wenn sich ein konisches Nukleokapsid ausgebildet hat, ist die Reifung beendet und das Virion ist infektiös.

1.5 Pathogenese und Infektionsverlauf bei HIV-1

1.5.1 Pathogenese

Bei der HIV-1-Infektion gelangt das Virus entweder direkt, z.B. durch intravenösen Drogenkonsum oder durch eine Bluttransfusion, oder über eine Verletzung der Schleimhäute ins Blut (Modrow S, 2003). Als erste Zielzellen in der Schleimhaut dienen vermutlich die Langerhans-Zellen der Schleimhäute. Von dort wird das Virus über die afferente Lymphflüssigkeit in die umliegenden Lymphgewebe und -organe transportiert. Die Lymphknoten bilden mit ihrem Netzwerk dendritischer Zellen ein Virusreservoir. Hier findet

die Vermehrung in dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und Monozyten statt. Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort werden stimuliert. Durch Infektion von Makrophagen gelangt HIV schon frühzeitig ins Gehirn. In der Latenzphase der Infektion findet man in den Keimzentren der Lymphknoten eine Anreicherung von HIV-infizierten Zellen und mit Antikörpern komplexierte Viren. Da dendritische Zellen in den Lymphknoten als Filter fungieren, begrenzen sie die Freisetzung der in den Lymphknoten gebildeten Viren ins Blut. Im peripheren Blut lassen sich daher kaum infektiöse Virionen nachweisen. Eine aktive Virusreplikation findet aber dennoch statt. Täglich werden bis zu 10^9 neue infektiöse Viruspartikel gebildet und ebenso viele $CD4^+$ -Zellen zerstört (Ho et al., 1995). Dies liegt daran, dass in der frühen Infektionsphase das Immunsystem noch so intakt ist, dass es die Virusreplikation kontrollieren kann. Für die Persistenz der HIV Infektion spielen in diesem Stadium $CD4^+$ -Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle (Modrow S, 2003). Beim Übergang dieser klinischen Latenzphase in die symptomatische Phase ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, die Virusreplikation zu kontrollieren. Dies liegt vor allem an der hohen Mutationsrate des HIV, die wie bereits oben beschrieben, auf die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase zurückzuführen ist. Zu dem produziert die RNA-Polymerase II neue HIV-1 Genome bei denen alle 10^4 Nukleotide ein Nukleotid falsch eingebaut ist, so dass jedes neu entstandene Virus ein bis zwei nicht komplementäre Nukleotide enthält (Modrow S, 2003). Dies führt dazu, dass innerhalb eines infizierten Organismus immer mehrere HIV-1 Quasispezies nebeneinander vorliegen. Unter dem Selektionsdruck, der durch das Immunsystem ausgeübt wird, ändern die Viren ständig die Epitope sowohl für die zelluläre, als auch für die humorale Immunantwort. So wird die Immunabwehr umgangen. Zusätzlich zur fehlenden immunologischen Kontrolle verändern die Viren ihre Replikationseigenschaften und zeigen einen veränderten Zelltropismus. Es lassen sich zwei verschiedene Varianten unterscheiden. Viren, die sich nicht oder schlecht in Zellkulturen vermehren lassen und Viren und nur wenige und kleine Syncytien bilden, werden als NSI-Viren bezeichnet. Solche, die schnell, mit hohen Titern in Kultur replizieren und die Bildung von großen Syncytien induzieren, werden als Syncytien-induzierende Stämme (SI-Stämme) bezeichnet. Die Syncytien-induzierenden Eigenschaften korrelieren mit dem Korezeptorgebrauch. SI-Viren nutzen den CXCR4-Rezeptor, NSI-Viren den CCR5-Rezeptor.

1.5.2 Infektionsverlauf

Die HIV-Infektion verläuft in drei Pasen: 1) die akute Phase, 2) die asymptomatische chronische Phase, 3) die symptomatische Phase. Zu Beginn der Infektion (akute Phase), kurz nach Eintritt des Virus in den Körper, findet eine massive Virusreplikation statt und es kommt zu einem vorübergehenden Absinken der $CD4^+$ -T-Lymphozyten auf unter 500 Zellen pro μ l Blut. Nach zwei bis sechs Wochen erfolgt eine zelluläre und humorale Immunantwort,

die meistens mit grippe- oder mononukleoseähnlichen Symptomen und Lymphknotenschwellung einher geht (Cooper et al., 1985; Embretson et al., 1993; Kahn et al., 1998). Dieses Krankheitsbild klingt innerhalb weniger Tage bis Wochen ab und es folgt ein symptomfreies Stadium der klinischen Latenz (asymptomatische Phase), das über Jahre hinweg andauern kann. Es ist gekennzeichnet durch niedrige Virustiter und kaum nachweisbare Viruspartikel im peripheren Blut. Mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) ist ein Nachweis der Virus-RNA jedoch in manchen Fällen möglich. Virusreplikation und Viruselimination durch das Immunsystem sind in diesem Stadium in einem Fließgleichgewicht. Im Verlauf erschöpft sich die zelluläre Abwehr und es kommt zu einer Reduzierung der CD4⁺-T-Lymphozyten (Fauci, 1996). Als Grund hierfür wird der programmierte Zelltod (Apoptose) diskutiert (Groux et al., 1992; Jaworowski et al., 1999). Außerdem kommt es zu einem Anstieg der CD8⁺-T-Suppressorzellen und damit zu einer Umkehr der CD4/CD8 Ratio (Cooper et al., 1985; Brodt et al., 1986; Cohn, 1989).

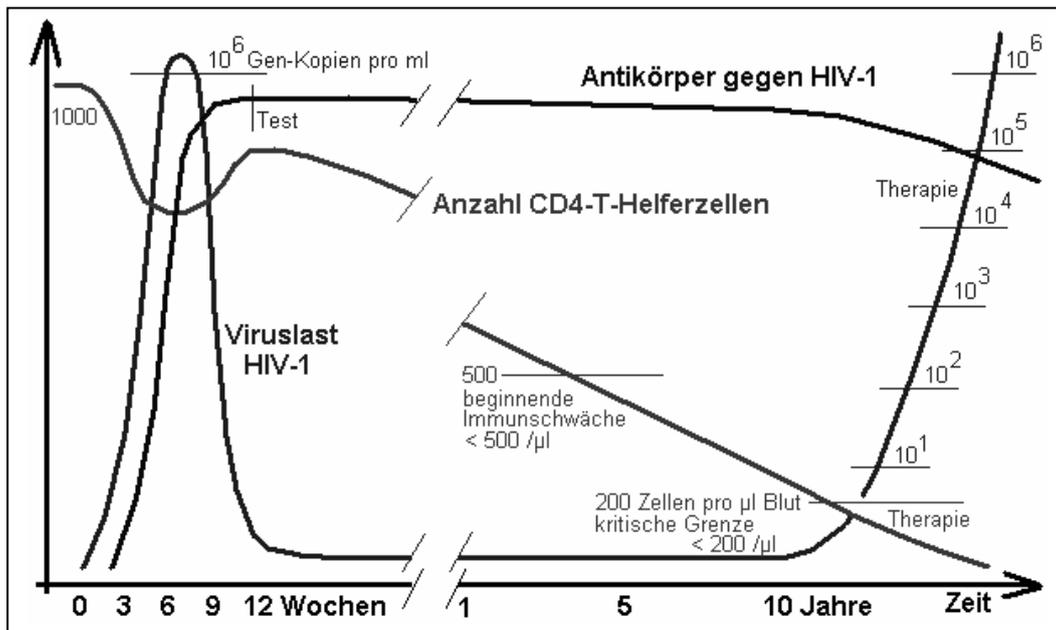


Abb. 4: Infektionsverlauf der HIV Infektion

Nach kurzzeitiger Virämie mit hoher Konzentration viraler RNA folgt eine über mehrere Jahre andauernde Latenzphase. Mit dem Anstieg der Viruslast und der Abnahme der CD4⁺-Lymphozyten kommt es zur Ausbildung von AIDS (verändert nach Bernhard Peter 2006)

Das AIDS-Stadium wurde früher ausschließlich durch das Auftreten bestimmter opportunistischer Infektionen oder Neoplasien definiert (Brodt et al., 1986; Cohn, 1989). Für die Beurteilung des Krankheitsstadiums (CDC-Klassifizierung A, B, C) werden die Erkrankungen, wie opportunistische Infektionen oder Neoplasien und die CD4⁺-Zellzahl berücksichtigt (CDC-Klassifizierung I, II, III). Daraus ergibt sich z.B. für einen niedrigen CD4⁺-Zellzahlstatus unter 200 Zellen/ μl und einer opportunistischen Infektion die CDC-Klassifizierung CIII. In der Zeit vor der antiretroviralen Therapie lag die mediane Zeit vom

Infektionszeitpunkt bis zum AIDS-Stadium bei 122 Monaten und vom Zeitpunkt der AIDS-Diagnose bis zum Tod bei durchschnittlich 20 Monaten (Hessol et al., 1994). Durch die hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) seit 1996 konnte diese Zeitspanne deutlich verlängert werden.

1.6 Antiretrovirale Therapie

Die Einführung der HAART führte bei den therapierten Patienten zu einer Erhöhung der CD4⁺-Zellzahl und einer oft jahrelangen Reduktion der Viruslast unter die Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml. Dadurch wird eine weitere Progression der Erkrankung verhindert und eine Erhaltung der Immunkompetenz so lange wie möglich gewährleistet (Egger et al., 1997; Hogg et al., 1997; Palella et al., 1998). Die Therapie sollte nach Beginn lebenslang fortgesetzt werden und erfordert eine hohe Adhärenz. Zurzeit stehen sechs verschiedene Medikamenten-Klassen für die Behandlung von HIV-1 zur Verfügung.

◆ Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI)

◆ Nukleosidische bzw. nukleotidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs bzw. NtRTI)

NRTIs sind Nukleosid- oder Nukleotidanaloga. Die Wirkungsweise der NRTIs beruht darauf, dass sie als Didesoxynukleosid bei der reversen Transkription von der DNA-Polymerase, aufgrund stärkerer Affinität zum Enzym, vermehrt eingebaut werden. Durch die fehlende OH-Gruppe an der 3'Position des Zuckers kann die Kette nicht verlängert werden und es kommt zum Abbruch der Transkription an dieser Stelle (Mitsuya et al., 1985; Richman et al., 2001).

◆ Nicht nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs)

NNRTIs interagieren mit der hydrophoben Region der p66 Untereinheit der RT und somit wird die Aktivität des Enzyms blockiert. Durch die Bildung eines inaktiven Komplexes in der Nähe der Substratbindestelle kommt es zu ihrer Blockierung (Esnouf et al., 1995).

◆ Proteaseinhibitoren (PIs)

Proteaseinhibitoren (PIs) hemmen die HIV-1 Protease (Debouck, 1992) und unterdrücken damit, im Gegensatz zu RT-Inhibitoren, den viralen Reifungsprozess, können aber die Produktion von Viruspartikeln in den infizierten Zellen nicht stoppen. PIs sind Moleküle, die mit den natürlichen Substraten, den Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen, kompetitiv um das aktive Zentrum der Protease konkurrieren. Nach der reversiblen Bindung an das aktive Zentrum der viralen Protease, die sich

strukturell von zellulären Proteasen unterscheidet, wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch das Enzym inaktiviert wird.

◆ **Eintrittsinhibitoren (EIs)**

◆ **CCR5-Antagonisten**

CCR5-Antagonisten hemmen die Interaktionen zwischen dem viralen Glykoprotein gp120 und dem zellulären Chemokinrezeptor CCR5 durch eine hochaffine Bindung an den Chemokinrezeptor. Bisher ist ein CCR5-Blocker zugelassen (Maraviroc).

◆ **Fusionsinhibitoren (FIs)**

Bisher ist nur ein Medikament aus dieser Klasse zugelassen. T20 ist ein Peptid, das an gp41 bindet und dadurch den weiteren Fusionsvorgang von Virus und Zelle blockiert (Wild et al., 1995; Kilby et al., 2003; Kilgore et al., 2003).

◆ **Integraseinhibitoren (INIs)**

Integraseinhibitoren können auf unterschiedliche Weise wirken. Die momentan am weitesten entwickelten Integraseinhibitoren verhindern eine Bindung der zellulären DNA am katalytischen Zentrum der Integrase, so dass es zu keinem Strangtransfer kommen kann. Ein Medikament dieser Stoffklasse wurde im Dezember 2007 zugelassen (Raltegravir).

Im Anhang in Tabelle 1 sind alle Medikamente und deren Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Wirkstoffklassen aufgeführt.

Als Standardtherapie werden heutzutage verschiedene Medikamente kombiniert, um eine vollständige Unterdrückung der Virusreplikation zu erzielen. Dabei ist zu beachten, dass die Kombinierbarkeit innerhalb und zwischen den Stoffklassen eingeschränkt ist. Es besteht oftmals eine Kreuzresistenz zwischen einzelnen Medikamenten einer Stoffklasse, so dass das vorliegende Resistenzprofil die Gabe eines bestimmten Medikaments nicht mehr erlaubt, obwohl dieses Medikament vorher noch nicht verabreicht wurde. Um das Virus an verschiedenen Angriffspunkten zu hemmen werden in der Regel Medikamente aus mindestens zwei unterschiedlichen Stoffklassen kombiniert.

Der Begriff der HAART wurde mit der Einführung der Proteaseinhibitoren als Bestandteil einer Kombinationstherapie geprägt. Die PIs ermöglichten als Teil einer Kombinationstherapie eine lang anhaltende Virussuppression, eine Immunrekonstitution und hatten einen dramatischen Einfluss auf Morbidität und Mortalität der HIV-Infektion (Li et al., 1998; Palella et al., 1998). Therapie-naiven Patienten wird eine Therapie, bestehend aus zwei Nukleosidanaloga und einer anderen Substanz, entweder NNRTI oder PI, empfohlen.

1.7 Resistenzentwicklung

Durch suboptimale Medikamenten-Wirkspiegel oder durch Mutationen in den Genen der viruseigenen Enzyme RT und Protease kann es schnell zu einer erhöhten Virusreplikation kommen. Daraus resultiert ein Therapieversagen. Jedes neu kopierte HIV-Genom enthält statistisch mindestens eine Punktmutation. Bei einer geschätzten Anzahl von täglich bis zu einer Milliarde neu produzierter Viren wird jede denkbare Virusvariante mit einer Punktmutation im Laufe eines Tages hergestellt (Perelson et al., 1996). So entstehen im Verlauf einer HIV-Infektion zahlreiche genetisch unterschiedliche replikationsfähige Varianten, die auch als Quasispezies bezeichnet werden (Clavel et al., 2004). Diese im Plasma neben dem dominanten Stamm persistierenden Virusvarianten werden auch als Minoritätenstämme bezeichnet, da sie eine Minderheit in der Viruspopulation darstellen. Diese Stämme können in Reservoirs abgelegt sein und werden unter den augenblicklichen Bedingungen nicht mehr vermehrt, da andere Stämme besser angepasst sind (Coffin, 1995; Domingo et al., 2001; Hance et al., 2001; Deeks et al., 2003; Metzner et al., 2003; Charpentier et al., 2004; Clavel, and Hance, 2004). Bei sich änderndem selektivem Druck kann eine Minderheit aufgrund eines Selektionsvorteils den prädominanten Stamm ablösen (Drake, 1993). Die Virusvarianten, die in Anwesenheit eines Medikaments replizieren können und sich demnach besser an den Selektionsdruck angepasst haben, werden als „resistent“ bezeichnet, da sie relativ zum Wildtypstamm gesehen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren besitzen.

PI-induzierte Mutationen werden in Primär- und Sekundärmutationen unterteilt. Primärmutationen verursachen die eigentliche Resistenz, indem sie die Aktivität der Protease in Anwesenheit eines PIs ermöglichen. Durch diese Mutationen werden aber in den meisten Fällen die Replikationsfähigkeit und damit die Fitness der Stämme herabgesetzt. Durch Sekundärmutationen, die im Anschluss auftreten, kann dieser Nachteil wieder kompensiert und damit die virale Fitness der neu entstandenen Virusvariante erhöht werden. Bei den Mutationen gegen NRTIs und NNRTIs wird keine solche Unterteilung vorgenommen. Es konnten bestimmte Muster bei der Resistenzentwicklung beobachtet werden, die das Auftreten der Resistenzmutationen in bestimmter Reihenfolge zeigten (Larder et al., 1989; Boucher et al., 1992; Beerwinkel et al., 2004). Es gibt Mutationen, die für ein bestimmtes Medikament eine Resistenz vermitteln, aber einen resensitivierenden Effekt bezüglich eines anderen Medikaments besitzen. Ermittelt werden die Resistenzen durch genotypische und phänotypische Resistenztests (Wilson, 2003).

1.8 Resistenzbestimmung

Medikamentenresistente HIV-Stämme stellen ein großes Problem bei der Therapie der HIV-Infektion dar. Die Bestimmung der Resistenzmuster mit den heute verfügbaren genotypischen und phänotypischen Testverfahren kann zu einer Therapieoptimierung beigetragen und so eine Resistenzentwicklung verlangsamt werden.

1.8.1 Phänotypische Resistenztestung

Bei einer phänotypischen Resistenztestung werden unterschiedliche Methoden angewandt. In einem Verfahren werden HI-Viren in peripheren mononukleären Blutzellen aus Patientenblut kultiviert. Anschließend wird dann die Wachstumsfähigkeit dieses Virus in Anwesenheit und Abwesenheit eines Medikaments gemessen. Eine andere Methode verwendet deletierte Plasmide, die mit der Sequenz des zu untersuchenden Gens des entsprechenden Patienten-Virusstamms komplettiert werden. Auch hier kann eine Aussage über die Wirksamkeit eines Medikaments anhand des Wachstums in Zellkultur getroffen werden. Durch Verdünnungsreihen der verschiedenen Medikamente wird die Höhe der Resistenz ermittelt. Der Vorteil der phänotypischen Resistenztestung ist, dass das Ergebnis in Form von x-facher Resistenz Aussagen über die Effekte aller Mutationen auf die Medikamentenempfindlichkeit ermöglicht.

1.8.2 Genotypische Resistenztestung

Bei der genotypischen Resistenzbestimmung wird die Nukleotidsequenz, die für die Aminosäuren der Reversen Transkriptase, Protease bzw. gp41, gp120 (Variable Region 3, V3) oder die Integrase kodiert, analysiert. Durch eine Direktsequenzierung der Genregionen kann die komplette Basenabfolge ermittelt und mit einer Wildtypreferenzsequenz (z.B. HXB2) verglichen werden. Da viele dieser Mutationen mit Resistenzen gegen bestimmte Medikamente einhergehen, kann anhand des ermittelten Mutationsmusters auf klinische Resistenzen geschlossen werden. Diese Resistenzprofile stellen ein sehr komplexes System dar, weil oftmals Resistenzmutationen gegen unterschiedliche Medikamente gleichzeitig vorliegen und im Gesamtzusammenhang gesehen werden müssen. Daher erfordert die Auswertung solcher Sequenzanalysen aufwendige Interpretationssysteme und zusätzlich ein hohes Maß an Erfahrung. Die Gefahr von Fehlinterpretationen ist höher als bei phänotypischen Resistenztests. Durch computergestützte Auswertungsverfahren, wie z.B. „*virtual phenotype*“ von Virco; „*geno2pheno*“, „*Stanford drug resistance database*“ und „*HIV-Grade*“ wird die Interpretation stetig verbessert. In verschiedenen Datenbanken (Los Alamos, Stanford) sind die publizierten Ergebnisse zu den einzelnen Mutationen zusammen gefasst und können abgefragt werden.

Vorteile der genotypischen Resistenztestung sind die schnelle Durchführbarkeit, der geringere Kostenaufwand und die Erkennung von resistenzrelevanten Mutationen vor dem klinisch sichtbaren Therapieversagen, was eine frühe Umstellung der Therapie ermöglicht. Die gesamte genetische Information ist in der Sequenz enthalten. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, diese zu interpretieren. Ein Nachteil ist, dass Virusstämme meist nur dann detektiert werden können, wenn sie mehr als 20% der Gesamtpopulation ausmachen (Schuurman et al., 1999; Schuurman et al., 2002; Metzner et al., 2005), so dass diese Analyse für die Detektion von Minderheiten, die auch therapie relevant sein können, nicht sensitiv genug ist.

1.8.3 Einsatz der Resistenzuntersuchungen

Ein Einsatz der genotypischen Resistenztestung ist bereits vor Beginn einer antiretroviralen Therapie sinnvoll, um übertragene resistente Stämme zu identifizieren, da das Phänomen der Primärresistenzen bei nicht vorbehandelten Patienten weiter zunimmt (Little et al., 2002; Simon et al., 2003; Oette et al., 2004; Wensing et al., 2005; Oette et al., 2006; Sagir et al., 2007). Die Testung ist hilfreich beim Management und der Kontrolle eines Therapieversagens, damit die Auswahl einer neuen Therapie so getroffen werden kann, dass mindestens drei antiretroviral wirksame Medikamente angewandt werden. Durch eine frühzeitige Resistenztestung kann das Medikament mit eingeschränkter Wirksamkeit identifiziert und umgestellt werden, bevor durch eine Replikationsaktivität auch gegenüber den anderen Substanzen zusätzliche Resistenzen entstehen. Bei einer unterdrückten Virusreplikation ist die Resistenzbildung ebenfalls unterdrückt. Bei fehlenden Resistenzmutationen könnte der Anstieg der Viruslast für eine andere Ursache sprechen, wie z.B. mangelnde Patientenadhärenz, Resorptionsprobleme oder Interaktion aller eingenommenen Medikamente.

1.9 Therapiepausen

Um mit der antiretroviralen Therapie die Virusreplikation zu unterbinden, muss sie über Jahrzehnte bzw. lebenslang eingenommen werden (Chun et al., 1999; Finzi et al., 1999). Aufgrund von starken Nebenwirkungen der Medikamente, geringer Adhärenz der Patienten und dem Auftreten von hochresistenten Virusstämmen (Palmer et al., 1999) wurde nach Alternativen zu einer dauerhaften antiviralen Therapie gesucht. Bei einer Therapiepause kann es durch den fehlenden selektiven Druck der Medikamente zu einer Veränderung des resistenten prädominanten Virusstamms hin zu einer sensitiveren Virusvariante kommen. In verschiedenen Studien wurde dieser Effekt untersucht und geprüft, ob die Therapieunterbrechung einen Vorteil für das längere Ansprechen einer Therapie nach der Pause bringt oder verringerte Nebenwirkungen erreicht werden könnte (Devereux et al., 1999; Verhofstede et al., 1999; Izopet et al., 2000; Miller et al., 2000; Rosenberg et al., 2000;

Deeks et al., 2001; Delaugerre et al., 2001; García et al., 2001; Hance et al., 2001; Zala et al., 2001; Falkensammer et al., 2002; Kijak et al., 2002; Deeks et al., 2003; Halfon et al., 2003). Da diese Untersuchungen an unterschiedlichen Patientenkollektiven durchgeführt wurden und die einzelnen Patienten schon verschiedene Voraussetzungen bezüglich der Vorbehandlung, des Immunstatus, der Viruslast, der Resistenzen mitbrachten, ist ein Vergleich schwierig. Eine groß angelegte Therapieunterbrechungsstudie (SMART) über 16 Monate mit 5472 Patienten, von denen 2752 Patienten CD4-Status geleitete Therapiepausen durchführten und das Vergleichskollektiv die antiretrovirale Therapie durchgehend einnahm, sollte Aufschluss über die generellen Effekte einer Therapiepause bringen (El-Sadr et al., 2006; Friedland, 2007). Bei der Studiengruppe mit der diskontinuierlichen Therapie traten im Gegensatz zu den dauertherapierten Patienten erheblich mehr Nebenwirkungen, wie opportunistische Infektionen oder sogar der Tod von Patienten, auf. Daher stellt eine Therapieunterbrechung keine Alternative zur kontinuierlichen Therapie dar und kann bei sehr niedrigen CD4-Zellzahlen ein hohes Risiko darstellen. Dennoch kommt es immer wieder zu Therapieunterbrechungen, die von den Patienten eigenständig durchgeführt werden, die durch Unverträglichkeit der Medikamente notwendig sind, oder aus einem anderen Grund eingeleitet werden. Daher ist es wichtig mehr über die Evolution von Virusstämmen unter diesen Bedingungen zu erfahren. Bei chronisch infizierten, massiv vorbehandelten Patienten stellt sich die Frage, inwiefern sich der vorherrschende Virusstamm nach Absetzen der Medikamente ändert, da die virale Fitness der resistenten Stämme oftmals herabgesetzt ist gegenüber der Fitness eines Virus mit Wildtypsequenz (Coffin, 1995; Back et al., 1996). Auch zu diesem Thema liegen bereits einige Daten vor (Devereux et al., 1999; Verhofstede et al., 1999; Izopet et al., 2000; Miller et al., 2000; Deeks et al., 2001; Delaugerre et al., 2001). Für eine erneute Therapie wäre die Beantwortung der Frage von Bedeutung, ob so genannte „*minor variants*“, Minderheitenstämmen, während einer Therapie in Reservoirs im Körper abgelegt werden und reaktiviert werden können. Wird ein „Gedächtnis“ gebildet, das sich an frühere Therapien „erinnert“ und bei Reexposition zu bereits in der Vergangenheit verabreichten Medikamenten wieder aktiv wird? Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass sich der neue dominante Stamm immer jeweils aus dem letzten dominierenden Stamm entwickelt, wobei Resistenzmutationen verloren gehen.

Im ersten Fall muss man bei der Wiederholung vormaliger Therapien mit einem schnellen Therapieversagen rechnen. Im zweiten Fall können vormalig eingesetzte Medikamente die Absenkung der Viruslast zur Folge haben. Bezüglich der Virusevolution in der Therapiepause sind noch viele Fragen ungeklärt, die auch durchaus für die Resistenzentwicklung von Bedeutung sein könnten.

1.10 Nachweis von Minderheitenpopulationen

Zu Beginn einer Therapie setzt sich die Viruspopulation durch, die sich an die bestehenden Umweltbedingungen am besten angepasst ist. Wenn resistente Stämme, die entweder übertragen wurden oder durch die hohe Replikations- und Mutationsrate entstehen, nach einem entsprechenden selektiven Druck prädominieren, werden die vorher vorherrschenden Wildtypviren zu einer Minderheit (Domingo et al., 2001). Wenn der Selektionsdruck durch Absetzen der Medikamente wegfällt, kann eine Wildtypvariante aufgrund der generell höheren Fitness von Wildtypvarianten (Harrigan et al., 1998; Martínez-Picado et al., 1999; Miller et al., 1999; Frost et al., 2000; Maree et al., 2000; Deeks et al., 2001) wieder dominant werden (Coffin, 1995; Hance et al., 2001; Deeks et al., 2003; Metzner et al., 2003; Charpentier et al., 2004; Clavel, and Hance, 2004) und die resistente Viruspopulation in einem Reservoir abgelegt werden. Diese resistenten Virusvarianten können bei der erneuten Gabe eines bereits verwendeten Medikaments wieder reaktiviert werden.

Die Prävalenz von Resistenzmutationen bei therapienaiven HIV-1 infizierten Patienten variiert zwischen 8-20% (Hecht et al., 1998; Little et al., 2002; Wensing et al., 2003; Oette et al., 2004; Wensing et al., 2005; Oette et al., 2006; Sagir et al., 2007). Die neu einsetzende hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) kann in 20-50% der vorher therapienaiven Patienten keine dauerhafte Suppression der Viruslast bewirken (Wensing and Boucher, 2003), wobei resistenzassoziierte Mutationen einer der Hauptgründe für ein Therapieversagen sind (Grant et al., 2002; Little et al., 2002; Violin et al., 2004). Wenn resistente Virusstämme bei therapienaiven Patienten aufgrund der hohen Mutationsrate oder übertragener Resistenz auch nur in kleinen Mengen koexistieren, können sie sich unter selektivem Medikamentendruck zur Hauptpopulation entwickeln (Domingo et al., 2001). Fällt der Medikamentendruck weg, kann die Wildtypvariante, die in den meisten Fällen eine bessere Replikationsaktivität, als mutierte Stämme hat, wieder prädominant werden (Coffin, 1995; Hance et al., 2001; Deeks et al., 2003; Metzner et al., 2003; Charpentier et al., 2004; Clavel, and Hance, 2004). Die resistenten Minoritäten werden wieder in der zirkulierenden Viruspopulation sowie in latenten Reservoiren archiviert. Da therapienaive Patienten ähnlichen Voraussetzungen bezüglich des selektiven Evolutionsdrucks ausgesetzt waren, wie Patienten in Therapiepause, wurden sie als Vergleichskollektiv gewählt. Da diese Patienten aber im Gegensatz zu den Patienten in Therapiepause noch nie eine Therapie eingenommen hatten, war die Diversität der präexistierenden Viruspopulationen auf die beschränkt, die übertragen wurden.

Die Rolle dieser minoren Viruspopulationen ist bisher ungeklärt und könnte sowohl bei therapienaiven Patienten, bezüglich übertragener Resistenzen oder auch bei vorbehandelten Patienten eine Rolle für die Therapie spielen.

1.11 Ziel der Arbeit:

In der vorliegenden Arbeit sollte die Dynamik von Viruspopulationen unter sich ändernden Therapiebedingungen beobachtet werden. In der Therapiepause sollen die Evolution von Virusvarianten erforscht und Evolutionsmodelle überprüft werden.

Da durch die Direktsequenzierung nur Populationen erfasst werden konnten, die mindestens 20% der Gesamtpopulation ausmachen, sollten neue experimentelle Ansätze zur Minderheitendetektion entwickelt werden. Es sollten Echtzeit PCR Analysemethoden für besonders interessante Aminosäurepositionen etabliert werden.

2 Material und Patienten

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstamm

Epicurian coli XL1-Blue für Klonierungen

NOVAGEN-MERCK (Darmstadt)

2.1.2 Nukleinsäuren

2.1.2.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Operon (Köln) synthetisiert und durch HPLC gereinigt.

Alle Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle in 5'⇒3' Richtung angegeben. Die angegebenen Positionen der Oligonukleotide im HIV-1 Genom sind relativ zur Sequenz des Referenzstammes HXB2.

Oligonukleotid	Sequenz 5'⇒3'	Position innerhalb des HXB2 Genoms
1 Res	GAA GAA ATG ATG ACA GCA TGT CAG GG	1822-1844
2 Res	TAA TTT ATC TAC TTG TTC ATT TCC TCC AAT	4173-4199
3 Res	ATG GYT CTT GAT AAA TTT GAT ATG TCC	3559-3582
4 Res	AGA CAG GCT AAT TTT TTA GGG A	2077-2095
Seq A	GAG CCA ACA GCC CCA CC	2149-2165
Seq B	CAA TGG CCA TTG ACA GAA G	2616-2634
Seq C	GGA TCA CCA GCA ATA TTC CA	3012-3031
Seq D	GGA ACT GTA TCC TTT AG/AC TTC CC	2232-2254
Seq F	TGG GCC ATC CAT TCC TGG CTT	2586-2606
Seq G	CAT CCC TGT GGA AGC ACA TT	2988-3004
Seq H	TCT GCT ATT AAG TCT TTT GAT	2512-2529
K103N LMF1	TTC AGA GAA CTT AAT AAG AAA ACT CAA GA	2781-2806
K103N LMR1	CCC ACA TCC AGT ACT GTT ACT GAT TT	2859-2881
K103N LM4rev	CCA CAT CCA GTA CTG TTA CTG ATT TG	2858-2880
K103N LM6rev	CCA CAT CCA GTA CTG TTA CTG ATT TA	2858-2880
Sonde K103N	6FAM-TTC TGG GAA GTT CAA TTA GGA ATA CCA CAT CC-TMR	2811-2839
Mpol3002	CTG TGG AAG CAC ATT GTA CTG	2982-3002
MINK 103	CCG CAG GGT TAA AAA AGA IA	2839-2858

MINK 103N	CGC AGG GTT AAA AAA GAI C	2840-2858
K70R P2neu	TTA ACC CTG CGG GAT GTG	2833-2847
K70R s.short	TCT ACT AAT TTT CTC CAG CTA GT--FL	2754-2773
K70R iLC	TTG CCA TAA AGA AGA AAG ACA G XACTA	2734-2752
V82A PRF3	GGT ACA GTA TTA GTA GGA CCT ACA	2472-2492
V82A PRR1	TGG TAC AGT TTC AAT AGG ACT AAT	2553-2573
V82AM2mut	TAT TAG TAG GAC CTA CAC CAG C	2479-2497
Sonde V82A	6FAM-CTC AGA TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CXT--PH	2527-2551
Pla F	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G	PQE-30UA
Pla R	CGT ATC ACG AGG CCC TTT CGT CTT	PQE-30UA
SDM F K70R	GCCATAAAGAAGAAAGACAGTACTAGATGGAGAAAATTAGTAG	2733-2775
SDM R K70R	CTACTAATTTTCTCCATCTAGTACTGTCTTTCTTTATGGC	2733-2775
SDM F K103N	CCGCAGGGTTAAAAAAGAACAAATCAGTAACAGTACTGGATGTG G	2839-2883
SDM R K103N	CCACATCCAGTACTGTTACTGATTTGTTCTTTTTTAACCCTGCGG	2839-2883
Oligonukleotid 1 amp	AGCATCTTACGGATGGCATG	1519-1539
Oligonukleotid 2 amp	CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC	1591-1612

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide mit Name und Position innerhalb des HXB2 Genoms

2.1.2.2 Klonierungsplasmide

pQE-30 UA: pQE-30 UA besitzt das β -Laktamasegen zur Selektion der plasmidhaltigen Bakterien mittels Ampicillin. Dieses Plasmid erlaubt eine direkte Insertion eines frisch hergestellten PCR-Produkts in den Expressionsvektor aufgrund der von der Polymerase angehängten Poly-A-Sequenz.

◆ Rekombinante Plasmide

In dieser Arbeit wurden Plasmide hergestellt, in die Wildtypsequenz der HIV-1 Protease, RT oder Protease und RT integriert wurden.

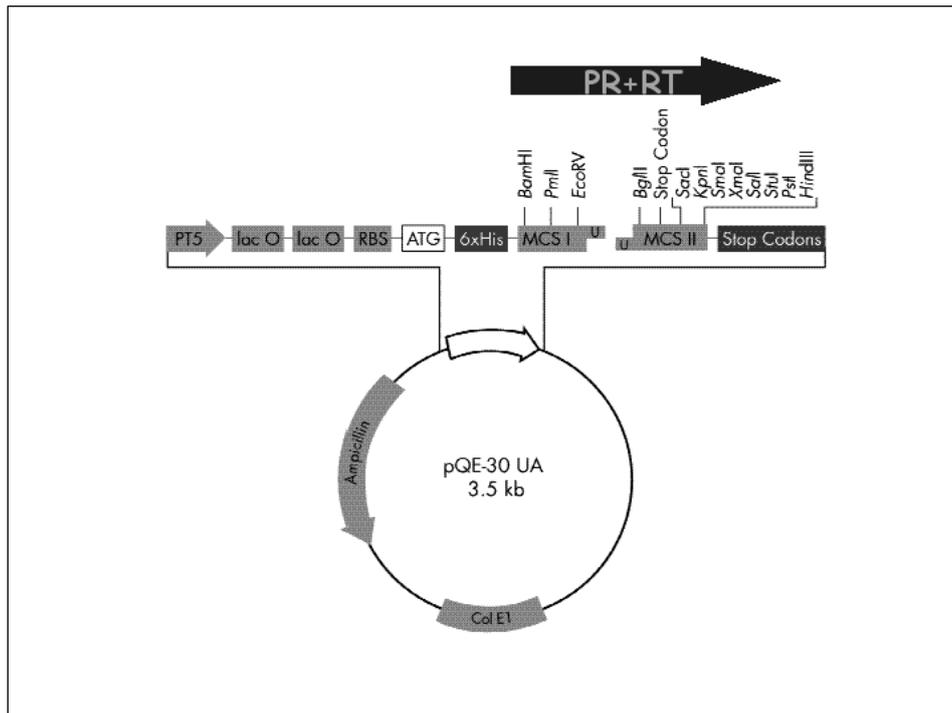


Abb. 5: Vektorkarte des pQE-30 UA Vektors (modifiziert nach Qiagen)

2.1.2.3 DNA-Längenstandard

- ◆ **100 bp DNA Leiter** INVITROGEN (Karlsruhe)
Der Längenstandard wurde zur Größenbestimmung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente von 100 bp bis 2 kb genutzt.
- ◆ **Lambda DNA/Eco91I (BstEII)** MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
Zur Größenbestimmung doppelsträngiger Plasmidfragmente von 117 bp bis 8454 bp.

2.1.2.4 Sonstige Nukleinsäuren

Desoxynukleotide (dNTPs) ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

2.1.3 Enzyme und Enzyminhibitoren

MuLV RT	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
Ampli Taq DNA Polymerase	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
HotStart Taq DNA Polymerase	QIAGEN (Hilden)
RNase-Inhibitor	BOEHRINGER (Mannheim)
UNG (Uracil N-Glucosylase)	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)

2.1.4 Reagenziensysteme

QIAamp Viral RNA Kit	QIAGEN (Hilden)
One Step RT-PCR Kit	QIAGEN (Hilden)
HIV-Genotyping Kit	ABBOTT (Wiesbaden)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
QiaPrep®Spin Miniprepkit ISO	QIAGEN (Hilden)
BigDye Cycle Sequencing	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
Ready Reaction Kit 2.0	ABBOTT (Wiesbaden)
QuikChange™Site-Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE (Heidelberg)
QIAexpress UA Cloning Kit	QIAGEN (Hilden)
LightCycler (LC) Taqman Masterkit	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
LC FastStart DNA Master SYBR Green1kit	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
LC FastStart DNA Master HybProbekit	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
LC FastStart DNA Master ^{plus} HybProbekit	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

2.1.5 Lösungen, Puffer und sonstige Chemikalien

10x Genetic Analyzer Buffer (enthält EDTA)	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
10x PCR (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8,3)	QIAGEN (Hilden)
Agarose Typ II (Medium)	SIGMA (Taufkirchen)
Ampicillin	SIGMA (Taufkirchen)
Ampuwa, <i>aqua ad injectabilia</i>	MERCK (Darmstadt)
Bromphenolblau	SERVA FEINBIOCHEMIKA (Heidelberg)
Eisessig	MERCK (Darmstadt)
Essigsäure	ROTH (Karlsruhe)
Ethanol 70%ig und 98%ig	ROTH (Karlsruhe)
Ethidiumbromidlösung 1 µg/ml	SERVA FEINBIOCHEMIKA (Heidelberg)
Glycerol	CALBIOCHEM (Schwalbach)
HCl	ROTH (Karlsruhe)
Isopropanol	MERCK (Darmstadt)
MilliQ Plus	FRESENIUS KABI (Darmstadt)
MgCl ₂ -Lösung 25 mM	QIAGEN (Hilden)
NaCl	ROTH (Karlsruhe)
Performance-Optimized-Polymer (POP)-6	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
RNase freies H ₂ O (Ampuwa)	MERCK (Darmstadt)
Sephadex™G-50 superfine	AMERSHAM PHARMACIA (Freiburg)
SeaKem®LE Agarose	BMA (Rockland)

Trypsin	INVITROGEN (Karlsruhe)
Xylen-Cyanol	SIGMA (Taufkirchen)

TE, pH 8,0:

10 mM Tris-HCl
0,04 M Tris-Acetat
1 mM EDTA

TAE-Puffer:

242 g Tris
57,1 ml Eisessig

10x Farbmarker für Agarosegele:

5 ml Glycerin
3 ml 5%ige Bromphenolblaulösung
3 ml 5%ige Xylen-Cyanol-Lösung
0,2 ml 50x TAE-Puffer
1,3 ml H₂O

2.1.6 Medien

Medium für die Bakterienkultivierung:

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, pH 7,2) INVITROGEN (Karlsruhe)

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Zusatz von Ampicillin:	100 µg/ml

LB-Agar:

Bacto-Agar	15 g/l
------------	--------

in LB-Medium (s.o.)

15 Min. bei 121° C autoklavieren, Agar auf 50° C abkühlen lassen, in Petrischalen gießen, abkühlen lassen und bei 4° C lagern. Das Medium bzw. der Agar wurden zur Selektion mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterial

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Centrifuge 5417C/15575	EPPENDORF (Hamburg)
Laborzentrifuge 2K 15	SIGMA (Taufkirchen)
Plattenzentrifuge	SIGMA (Taufkirchen)

Elektrophorese-Geräte:

Elektrophorese Power PAC (Netzteil)	BIORAD (München)
Gelelektrophoresekammer Sub-Cell GT	BIORAD (München)
Geldokumentationsanlage 75S/03646	BIORAD (München)

Sonstige Geräte:

Wasserstrahlpumpe	IKA Labortechnik (Staufen)
Thermomixer 5436	EPPENDORF (Hamburg)
Magnetrührer IKAMAG	IKA Labortechnik (Staufen)
PCR-Thermoblock TRIO	BIOMETRA (Göttingen)
PCR-Thermoblock PE 9600	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
LightCycler®2.0	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
LightCycler®480	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
MagNA Pure® Compact	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)
pH-Meter 538	WTW (Weilheim)
Reinstwasseranlage Milli-QPlusPF	MILLIPORE (Eschborn)
Sterilbank Clean Air CA/REV4	CLEAN AIR TECHNIK (Woerden)
ABI 310 Genetic Analyzer	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
ABI 3100 Avant Genetic Analyzer	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
UV-VIS-Spektrometer	BIORAD (München)
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB-Biotechnologie (Erlangen)
MultiScreen Column Loader	MILLIPORE (Eschborn)
MultiScreen 96 Mikrotiterplatte MAHK-N45	MILLIPORE (Eschborn)

Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff und Glas wurden von den Firmen EPPENDORF (Hamburg), FALCON (Heidelberg), GREINER (Frickhausen), SARSTEDT (Nümbrecht), PE BIOSYSTEMS (Weiterstadt) und NEOLAB (Heidelberg) bezogen.

2.1.8 Software zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten

Sequence Analysis Version 3.2	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
ViroSeq HIV Genotyping System Software 2.5	APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt)
DNASTAR Lasergene	GATC GmbH (Konstanz)
ClustalX	EMBL-Heidelberg (Heidelberg)
Light Cycler Software 4.05	ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

2.1.9 Datenbanken:

Arevir Database	Interne HIV-Datenbank
ROSIE	Interne HIV-Datenbank
Vorhersageprogramm geno2pheno	http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl
HIV- Drugresistance Database Stanford	http://hivdb.stanford.edu/
Los Alamos Datenbank	http://www.hiv.lanl.gov/content/index

2.2 Patienten

2.2.1 Patientenkollektiv 1: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“, „in“ und „nach“ einer Therapiepause

Aus dem Patientenkollektiv von vierzehn Patienten, die sich in einer Therapiepause befanden, standen pro Patient mindestens drei Proben zur Verfügung. Die Proben stammten von HIV-1 infizierten Patienten aus den HIV-Ambulanzen der Universitätskliniken Bonn, der Universitätsklinik zu Köln, der Spezialambulanz der Hautklinik der Uniklinik zu Köln und der MX01-Ambulanz der Universität Düsseldorf. Um die Evolution der Virusstämme in der Therapiepause zu analysieren wurden Resistenzprofile „vor“, „in“ und „nach“ der Unterbrechung der Therapie durch eine Direktsequenzierung erstellt. So war es möglich, den Rückgang resistenzassoziierter Mutationen der Virusstämme nachzuvollziehen und die Dynamik unter sich änderndem selektivem Druck zu ermitteln. Die Zeitpunkte wurden zu Beginn der Pause als Genotyp 0 (G_0), in der Therapiepause als Genotyp 1 (G_1) und nach der Pause als Genotyp 2 (G_2) gewählt. Bei den meisten Patienten wurden in der Pause weitere Genotypen erstellt die dann mit den Subindizes 1A, 1B, 1C, usw. markiert wurden. Bei G_0 ist davon auszugehen, dass das ermittelte Resistenzprofil die bestehenden Mutationen zum Beginn der Pause widerspiegelte, da es erst nach zwei-drei Wochen innerhalb einer Pause zu Änderungen im Mutationsprofil kommt. Median befanden sich die Patienten bereits 2,5 Tage (54 Tage vor bis 20 Tage in Pause) in der Therapiepause, als die Probe entnommen

wurde. G_1 wurde median nach 67 Tagen (22-159 Tagen) analysiert und unter der neuen Therapie (G_2) wurde nach median 39 Tagen (26-188 Tage) ein genotypischer Resistenztest durchgeführt.

Da es sich bei den Untersuchungen um eine retrospektive Analyse handelte, stand nur bereits vorhandenes Material zur Verfügung.

2.2.2 Patientenkollektiv 2: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“ und „in“ einer Therapiepause

Aus dem Patientenkollektiv von 57 Patienten, die sich in einer Therapiepause befanden, standen pro Patient mindestens zwei Proben zur Verfügung. Die Proben stammten von HIV-1 infizierten Patienten aus der HIV-Ambulanz der Universitätsklinik Bonn, HIV-Ambulanz der Universitätsklinik zu Köln, Spezialambulanz der Hautklinik zu Köln und der HIV Ambulanz der Universität Düsseldorf. Um die Evolution der Virusstämme in der Therapiepause zu analysieren wurden Resistenzprofile vor und während der Unterbrechung der Therapie durch eine Direktsequenzierung erstellt. Anhand dieser Daten sollen neue Erkenntnisse bezüglich der Virusdynamik der Viruspopulationen geklärt werden. Als Zeitpunkte wurden Proben der Patienten zu Beginn der Pause (G_0) und in der Pause (G_1) analysiert. Wenn vorhanden, wurden weitere Genotypen in der Pause ebenfalls untersucht und mit dem Subindex 1A, 1B, usw. markiert. Median wurde die Probe G_0 genau zu Beginn der Therapieunterbrechung den Patienten entnommen (von 44 Tagen vor bis 33 Tage in der Pause) und nach median 61 Tagen in der Pause (30-569 Tage) ein weiterer Genotyp (G_1) analysiert. Bei 30 der 57 Patienten wurde ein weiterer Genotyp in der Pause erfasst (G_{1b}) und bei 15 Patienten ein dritter Genotyp in Pause (G_{1c}). G_{1d} konnte bei 5 Patienten analysiert werden.

2.2.3 Patientenkollektiv 3: Seren therapienaiver HIV-1 infizierter Patienten

Die therapienaiven Patienten wurden als Vergleichskollektiv zu den Patienten in Therapiepause gewählt, da sie ähnlichen Voraussetzungen bezüglich des selektiven Evolutionsdrucks ausgesetzt waren. Da diese Patienten aber im Gegensatz zu den Patienten in Therapiepause noch nie eine Therapie eingenommen haben, sind Resistenzen, wenn vorhanden, bereits durch die Infektion mit resistenten Viren übertragen worden. In der hier vorliegenden retrospektiven Analyse wurden 159 therapienaive Patienten der RESINA-Kohorte, dem Projekt „*primary drug resistance in treatment naïve HIV-infected patients*“ (RESINA), einem Multizenterkooperationsprojekt in Nordrhein-Westfalen, Deutschland, zwischen 2001 und 2005 bezüglich des Genotyps der Reversen Transkriptase, einer resistenten Minorität an Position 103 der RT untersucht. Alle Populationen mit einem

geringeren Anteil als 20% werden in der folgenden Analyse als Minderheit definiert. Bisher ist aber noch nicht geklärt; welche klinische Relevanz diese Minderheiten bezüglich der primären HAART haben. Die Einschlusskriterien waren eine dokumentierte HIV-1-Infektion, Berechtigung für die Anwendung von HAART, keine vorherig eingenommene antiretrovirale Therapie. Von jedem Patient wurde eine Probe vor Beginn der Therapie analysiert, eine Direktsequenzierung der RT und 12 Wochen Informationen über die Therapie und die Viruslast standen zur Verfügung.

2.2.4 Weitere Patientenproben

Für den Nachweis einer proteaseassoziierten Mutation eines Patienten der RESINA-Kohorte. Dieser Patient war ein 41 Jahre alter Schwarzafrikaner aus Togo, bei dem 2003 eine HIV-1-Infektion diagnostiziert wurde. Da er unter einer Primärtherapie mit Lopinavir, AZT und 3TC (Start 5/2003) versagte wurden zwei Proben dieses Patienten genotypisch untersucht. Probe 1: Probe vor Therapie (Abnahmedatum 4/2003); Probe 2: Probe nach Therapieversagen (Abnahmedatum 12/04). Zusätzlich wurde mit diesen beiden Proben ein Minderheitenassay für die Proteasemutation V82A durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Isolierung viraler RNA HIV infizierter Patienten

3.1.1 Abtrennung der Zellbestandteile von EDTA- Blut

Um die Zellbestandteile des Bluts vom Plasma abzutrennen, wurde die Blutprobe bei 3000xg zehn Min. zentrifugiert, so dass die zelluläre Fraktion am Boden der Probenröhrchen sedimentierte. Die zellfreie Plasmafraktion, die sich als Überstand gebildet hatte, wurde abgenommen und bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Durch diese Lagerung blieb die Probe über einen langen Zeitraum stabil.

3.1.2 Prinzip der HIV-RNA Isolierung

Zur Isolierung der HIV-RNA aus Plasma (EDTA-Blut) oder aus zellfreien Zellkulturüberständen wurde das *QIAamp Viral RNA Kit* von QIAGEN verwendet. Unter denaturierenden Bedingungen wurde die virale RNA aus 280 μ l Plasma freigesetzt und unter geeigneten Pufferbedingungen reversibel an eine Silikamatrix gebunden. Nach mehrfachem Waschen wurde die RNA durch einen Puffer mit geringerer Ionenstärke von der Matrix mit 40 μ l Elutionspuffer gewaschen. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80° C.

3.2 Reverse Transkription

Während der reversen Transkription (RT) wurde zunächst die einzelsträngige HIV-RNA in doppelsträngige DNA, sogenannte „*complementary*“ DNA (cDNA) transkribiert. Die RT wurde bei geeigneten Pufferbedingungen, unter Zugabe von 10 mM freien Nukleotiden, geeigneten Oligonukleotiden und einer retroviralen RNA-abhängigen DNA Polymerase durchgeführt. Routinemäßig wurde bei den meisten Proben in dieser Arbeit eine reverse Transkription mit einer direkt anschließenden PCR als One-Step-RT-PCR durchgeführt. Bei Proben mit negativem Ergebnis wurde die RT-PCR in einer zwei Schritt Reaktion mit dem kommerziellen Kit (HIV-Genotyping Kit) der Firma ABBOTT wiederholt.

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen, die durch Bindung zweier Oligonukleotide an eine DNA-Matrize begrenzt wird (Mullis et al., 1987). Die Oligonukleotide dienen einer DNA-abhängigen DNA Polymerase als Oligonukleotid für eine anschließende Synthesereaktion.

Diese thermostabile Polymerase wird unter anderem aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert. Diese *Taq*-Polymerase hat den Vorteil, dass es bei der sich zyklisch wiederholenden Denaturierungstemperatur nicht zur Inaktivierung des Enzyms kommt. So wurde eine exponentielle Vervielfältigung der Zielregion erreicht.

3.3.1 „Hot start“ PCR

Bei der „*Hot start*“ PCR wird eine zunächst inaktive *Taq*-Polymerase verwendet. Dies verhindert, dass sich nach Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz schon vor der eigentlichen PCR unspezifische Produkte bilden. Dies geschieht durch Extension von Oligonukleotiddimeren und unspezifischer Bindung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize vor dem ersten Denaturierungsschritt. Die Inaktivierung der Polymerase wird durch Bindung eines thermolabilen Antikörpers oder einer chemischen Modifikation erzielt. Aktiviert wird die ‚*Hot start*‘ *Taq*-Polymerase durch Erhitzen auf 95° C für 15 Min. Durch diesen Denaturierungsschritt wird entweder der thermolabile Antikörper denaturiert oder die chemische Modifikation abgespalten.

3.3.2 „Nested“ PCR

Die „*Nested*“ PCR beinhaltet zwei aufeinander folgende PCRs, die mit zwei ineinander geschachtelten Oligonukleotidpaaren durchgeführt werden. Ziel dieser beiden aufeinander folgenden Reaktionen ist die Erhöhung der PCR Produktmenge. Dies ist vor allem dann nötig, wenn die DNA-Matrize in nur sehr geringer Kopienzahl im Ausgangsmaterial vorhanden ist. Dies ist der Fall, wenn die Ziel-DNA in einem DNA-Gemisch vorliegt und nur einen geringen Teil der Gesamt-DNA ausmacht oder wenn Verunreinigungen die Ausbeute an DNA verringern.

3.3.3 „Touch down“ PCR

Eine „*Touch down*“ PCR wird durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Produkte zu steigern. Dafür wird die Hybridisierungstemperatur für die Oligonukleotide in den ersten Zyklen der Kettenreaktion von etwa 10° C über der tatsächlichen Schmelztemperatur des Oligonukleotid-Matrizen-Hybrids zu einer Temperatur von etwa 5° C unterhalb dieses Wertes mit einem Temperaturinkrement von -2° bis -4° C pro Zyklus verringert. Die „*Touch down*“ PCR nutzt die höchstmögliche *Annealing*temperatur. Wird im folgenden Zyklus eine geringere Anlagerungstemperatur gewählt, können zwar theoretisch unspezifische Nebenprodukte entstehen, jedoch werden bevorzugt Produkte aus den vorhergehenden erfolgreichen Zyklen gebildet. Ohne die exakte Hybridisierungstemperatur zu kennen,

entstehen so spezifische PCR-Produkte ohne störende Nebenprodukte. Die Ausbeute an Amplifikaten wird ebenfalls erhöht.

3.3.4 „One Step“ RT-PCR

Bei der „One Step“ RT-PCR sind RT und PCR in einem Reaktionsgemisch zusammengefasst. Hier wird ein Enzymgemisch aus einer Reversen Transkriptase und einer 'Hot start' Polymerase eingesetzt. Im ersten Schritt wird die RNA bei einer Temperatur, die von der verwendeten RT (zwischen 37° und 50° C) abhängig ist, in cDNA transkribiert. Im zweiten Schritt wird die DNA-Polymerase aktiviert. Sie liegt zunächst als inaktive Vorstufe vor und muss durch eine initiale Hitzedenaturierung aktiviert werden. Dies bewirkt gleichzeitig eine Inaktivierung der RT. Anschließend folgt eine PCR mit bis zu 45 Zyklen. Der Vorteil einer solchen kombinierten Methode ist, dass es im Vergleich zu zwei getrennten Reaktionen nicht so leicht zu Kontaminationen kommen kann. Nachteilig ist, dass beide Enzyme im gleichen Puffersystem arbeiten müssen. Da RT und DNA Polymerase unterschiedliche Pufferbedingungen erfordern, ergibt sich hier nur eine Kompromisslösung. Oftmals ist daher eine getrenntes RT- und PCR-System sensitiver.

3.4 Amplifikation des Protease- und Reverse Transkriptase- kodieren Gens *pol* von HIV-1

Für die zu amplifizierenden Genombereiche des *pol*-Gens wurden unterschiedliche Methoden angewendet, um z.B. auch HIV-1 Isolate mit verschiedenen Subtypen amplifizieren zu können, eine gesteigerte Spezifität zu erreichen oder durch Modifikation der Methode Zeit einzusparen.

3.4.1 „One Step“ RT-PCR und „Nested“ PCR (Standardmethode, „in house“-System)

Zunächst wurde eine zuverlässige „Nested“ PCR etabliert, deren erste PCR auch bereits eine RT beinhaltete. Bei dieser ersten „One step“ RT-PCR stand das „One step“ RT-PCR-Kit der Firma QIAGEN zur Verfügung. Als Oligonukleotide wurden für die erste Reaktion die Oligonukleotide 1 Res und 2 Res eingesetzt. Durch den Einsatz von „Q-Solution“, einer Komponente des „One step“ RT-PCR-Kits (QIAGEN), die das Schmelzverhalten der DNA beeinflusste, wurden beide Ansätze optimiert. Das entstandene erste PCR Produkt hat eine Größe von 2377 bp, dieses Fragment konnte nicht immer in einem Agarosegel nachgewiesen werden, da die Produkt-Menge nach der ersten PCR zu gering war. Als Endprodukte nach der 2. PCR mit den 3Res und 4Res Oligonukleotiden entstand ein 1505 bp großes Fragment, das für die Protease und die RT kodiert.

Methoden

„One Step“ RT-PCR-Standardansatz:

		Endkonz.:
5x „One Step“ RT-PCR-Puffer	10 µl	1x
dNTP-Lösung (je 10mM)	2 µl	0,4 mM
RT-PCR Enzym-Mix	1 µl	
RNase-Inhibitor 10 U/µl	1 µl	10 U
3' Oligonukleotid 10 µM	0,5 µl	0,1 µM
5' Oligonukleotid 10 µM	0,5 µl	0,1 µM
5x „Q-Solution“	10 µl	1x
RNA-Matrize	bis zu 10 µl	10 ⁶ RNA Kopien
RNase freies Wasser	ad 50 µl	

„Nested“ PCR-Ansatz:

		Endkonz.:
10x PCR-Puffer	10 µl	1x
dNTP-Lösung (je 10 mM)	2 µl	0,2 mM
„Hot start“-Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl	5 U
3'-Oligonukleotid 10 µM	0,3-1,5 µl	0,03-0,15 µM
5'-Oligonukleotid 10 µM	0,3-1,5 µl	0,03-0,15 µM
5x „Q-Solution“	20 µl	1x
DNA-Matrize aus 1.PCR	5 µl	
H ₂ O Ampuwa	ad 100 µl	

PCR-Bedingungen für die „One Step“ RT-PCR:

Reverse Transkription	50° C	30 Min.	
Aktivierung der Polymerase	95° C	15 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	
Anlagerung der Oligonukleotide	65° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	
Anlagerung der Oligonukleotide	60° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	} x 46
Anlagerung der Oligonukleotide	55° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72° C	10 Min.	

PCR-Bedingungen für die „*Nested*“ PCR:

Aktivierung der Polymerase	95° C	15 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	
Anlagerung der Oligonukleotide	65° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	
Anlagerung der Oligonukleotide	60° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	} x 45
Anlagerung der Oligonukleotide	55° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	3 Min.	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72° C	10 Min.	

3.5 HIV Genotyping Kit (RT-PCR; kommerzielle Methode)

Bei einem negativen Ergebnis mit der oben beschriebenen Standardmethode wurde mit Hilfe des HIV *Genotyping Kit* (RT-PCR) der Bereich des *pol*-Gens, der für die RT und die PR kodiert, amplifiziert. Aufgrund von Sequenzunterschieden der Oligonukleotide im Vergleich zu der nicht kommerziellen Methode, war die Affinität zur Oligonukleotidbindestelle der entsprechenden Zielregion des Genoms bei manchen Patientenproben stärker, so dass trotz negativer Ergebnisse bei der ersten Methode ein Produkt amplifiziert werden konnte. Bei anderen Proben konnte eine stärkere Affinität der Standardoligonukleotide beobachtet werden. Diese Unterschiede traten besonders oft bei verschiedenen HIV-1 Subtypen auf, aber auch innerhalb eines Subtyps waren einzelne Sequenzunterschiede selbst in der konservierten Genregion, an die sich die Oligonukleotide anlagern, nicht selten nachzuweisen. Bei dem hier beschriebenen System war eine getrennte RT einer PCR vorgeschaltet. RT und PR wurden als ein Produkt amplifiziert. Als RT wurde ein Enzym eingesetzt, das aus dem murinen Leukämievirus isoliert wurde, und für die PCR wurde eine *Taq*-Polymerase verwendet. Der Nachteil dieses Reagenziensystems war, dass es nur geringe Möglichkeiten gab, die Spezifität der PCR zu erhöhen und die Sensitivität im Gegensatz zu den bereits oben beschriebenen Methoden zu erniedrigen. Von Vorteil war zum Einen die Zeitersparnis, da nur eine PCR ausreichte, um genügend Produkt zu amplifizieren, und zum Zweiten war die Chance erhöht, DNA aus Proben zu amplifizieren, die im „*in-house*“-System nicht analysiert werden konnten. Die PCR wurde mit dUTP statt mit dTTP durchgeführt. Die Zugabe des Enzyms UNG (Uracil N-Glucosylase) zum PCR-Ansatz

führte zum Abbau von DNA, die statt dTTP dUTP enthält. So wurde verhindert, dass kontaminierende DNA aus früheren PCR Reaktionen weiter amplifiziert wurde.

RT-Ansatz:

RT-Mix	8 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
MMuLV (Reverse Transkriptase)	1 μ l
RNA-Matrize	10 μ l

Bedingungen der Reversen Transkription:

Reverse Transkription:	42° C	1 Std.
------------------------	-------	--------

PCR Ansatz:

PCR-Mix	29,5 μ l
UNG (Uracil N-Glucosylase)	1 μ l
Ampli <i>Taq</i> Gold	0,5 μ l
DNA Matrize aus RT	20 μ l

PCR-Bedingungen:

Aktivierung der UNG	50° C	10 Min.	} x 42
Aktivierung der Ampli <i>Taq</i> Gold	93° C	12 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	93° C	20 Sek.	
Anlagerung der Oligonukleotide	64° C	45 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	66° C	3 Min.	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72° C	10 Min.	

3.6 Sequenzierung

3.6.1 Sanger-Methode der DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode durch den Einbau von Dideoxynukleotiden. In der Sequenzreaktion werden dem Reaktionsgemisch neben den regulären dNTPs, die zur Extension der Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase benötigt werden, zusätzlich in einem gewissen Prozentsatz (ca. 6%) 2',3'-Dideoxynukleotide zugegeben. Da diese Dideoxynukleotide an der 3'-Position keine Hydroxygruppe besitzen, kommt es nach ihrem Einbau in den neusynthetisierten Strang an

dieser Stelle zum Kettenabbruch. Es werden vier Reaktionsgemische parallel angesetzt. Jedem der Ansätze wird neben den dNTPs jeweils eine Dideoxyvariante (entweder ddTTP, ddGTP, ddCTP oder ddATP) hinzugefügt. Die Mischung von dNTPs und ddNTPs ist so gewählt, dass es statistisch gesehen an jeder Stelle einmal zum Einbau eines ddNTPs und damit zu Kettenabbruch kommt. Während der Sequenzreaktion entstehen so verschieden lange Fragmente, die immer am 3' Ende das dem Ansatz zugesetzte Dideoxynukleotid aufweisen. Trennt man in einem denaturierenden Acrylamidgel die Sequenzprodukte der Größe nach durch Elektrophorese auf, kann man aufgrund der Laufstrecke die Position des dem Ansatz zugesetzten Dideoxynukleotids erkennen. Lässt man die Ansätze mit den unterschiedlichen Dideoxynukleotiden nebeneinander in einem Gel laufen, kann durch Laufstreckenvergleich ein direkter Schluss auf die Nukleotidabfolge in der Sequenz gezogen werden (Sanger et al., 1992). Die Sequenzprodukte können durch Radioaktivität oder Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

3.6.2 Sequenzreaktion

In dieser Arbeit wurde eine Modifikation der Sanger-Grundtechnik und das *ABI PRISM BigDye™ Cycle Sequencing Ready Kit 2.0* der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieses Kit enthält einen fertigen Sequenzansatz mit Reaktionspuffer, DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid und dNTPs mit einem bestimmten Prozentsatz BigDyes™. BigDyes™ sind mit Fluoreszenzfarbstoffen modifizierte Dideoxynukleotide. Jedes der vier unterschiedlichen Dideoxynukleotide ist mit einer anderen Farbe markiert und so ist es möglich die Reaktion statt in vier getrennten Ansätzen in einem Reaktionsansatz durchzuführen. Es entstehen bei der Sequenzreaktion, je nach Zeitpunkt des Kettenabbruchs und Art des zuletzt eingebauten ddNTPs, verschieden lange und unterschiedlich markierte DNA-Fragmente. Es wurde eine mutierte und in *E. coli* expremierte *Taq*-Polymerase verwendet, die die mehrfache Wiederholung der Sequenzreaktion und damit die Verwendung geringerer Templatemengen erlaubte. Die Δ 5'-3' Exonuklease Deletion und die Mutation T558G der Polymerase ermöglichten größere Leseweiten und einen verbesserten Einbau der fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Die endständig markierten DNA-Fragmente ließen sich mit Hilfe des *ABI 310™ Genetic Analyser* oder dem *ABI 3100 Avant Genetic Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS) nach der Größe auftrennen. Das zuletzt eingebaute Nukleotid konnte aufgrund der Modifikation von den anderen Nukleotiden unterschieden werden. Dem fertigen Reaktionsgemisch des *Abbott BigDye™ Cycle Sequencing Ready Kit 2.0* wurden das aufgereinigte PCR-Produkt der *pol*-Region und das Sequenzoligonukleotid hinzugefügt. Um den gesamten Genbereich abzudecken und nach der Sequenzierung eine gesicherte Aussage über die Nukleotidabfolge der Sequenz treffen zu können, wurde in der Sequenzreaktion eine Probe mit sieben verschiedenen Fragmenten

angesetzt, so dass sieben sich überlappende Fragmente sequenziert werden konnten. Mit den Oligonukleotiden A, B, C und D wurde der DNA-Sinnstrang und den Oligonukleotiden F, G und H der Gegenstrang sequenziert (siehe Abb. 6).

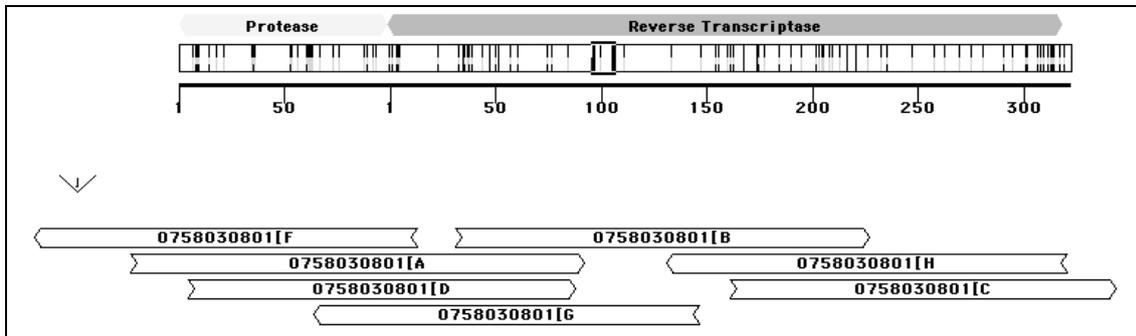


Abb. 6: Die sieben Sequenzfragmente A-H, die bei der Sequenzreaktion der Reversen Transkriptase und Protease entstehen

Der Ansatz für die Sequenzreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

	Endkonz.:
PCR-Produkt (3,5 µl)	60-130 ng
Oligonukleotide A, B, C, D forward	je 3,2 pmol
F, G, H reverse	
„Terminator Reaction Mix“	5,5 µl
H ₂ O (Ampuwa)	ad 20 µl

Die Sequenzreaktion wurde in einem PCR-Thermoblock unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung der DNA Matrize	96° C	10 Sek.	} x 36
Anlagerung der Oligonukleotide	50° C	10 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	60 °C	4 Min.	

3.7 Aufreinigung der Sequenzprodukte

Nach durchgeführter Sequenzreaktion lagen neben den fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten, die später sequenziert wurden, noch überschüssige Dideoxynukleotide und Oligonukleotide in der Probe vor. Um diese zu entfernen und somit fehlerhafte Signale und eine daraus resultierende schlechte Auflösung der Nukleotidsequenz zu minimieren, wurden die Sequenzprodukte vor der elektrophoretischen Analyse durch den *ABI PRISM™ 310*

Genetic Analyser oder *ABI 3100 Avant Genetic Analyzer* gereinigt. Die Aufreinigung der Sequenzprodukte erfolgte über Sepharosesäulen (Sephadex TMG-50 superfine-Pulver mit 300 µl Ampuwa-Wasser vorgequollen). Diese Aufreinigungsmethode beruhte auf dem Prinzip der Gelfiltration. Das chromatographische Verfahren der Gelfiltration trennt Moleküle aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Die Sequenzprodukte wurden auf eine vorgequollene Gelmatrix aus Sepharose aufgetragen. Während die freien Didesoxynukleotide in der Lage waren, in das Innere der Gelpartikel zu diffundieren und dort festgehalten wurden, wurden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente von diesem molekularen Sieb ausgeschlossen und erschienen im Eluat.

3.8 Sequenzierung

Mit Hilfe des *ABI 310TM* oder *ABI 3100 Avant Genetic Analyser* (Applied Biosystems) wurden die in der Sequenzreaktion entstandenen 3' fluoreszenzmarkierten DNA-Extensionsprodukte elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt. Für die Sequenzierung wurde das Sequenzprodukt (gelöst in Wasser) in spezielle Probengefäße überführt, die mit einem Septum, das die spätere Injektion der Kathode und Kapillare ermöglichte, verschlossen waren. Die Auftrennung erfolgte mittels Kapillarelektrophorese in einer Glasfaserkapillare, die mit Polymer gefüllt war. Nach Anlegen einer Injektionsspannung von 2 kV im Probengefäß sammelten sich die DNA-Extensionsprodukte an der Kathodenseite der Kapillare. Anschließend kam es in der Kapillare zu einer Auftrennung der Sequenzprodukte nach Größe. Am anodennahen Ende der Kapillare durchliefen die aufgetrennten Sequenzprodukte einer Probe ein Detektionsfenster, durch das die fluoreszenzmarkierten Fragmente von einem Argonlaser angeregt wurden. Sie emittierten eine Fluoreszenz, die mit Hilfe eines CCD-Chips detektiert werden konnte.

Die folgenden Einstellungen werden am Sequenzer vorgenommen:

Module:	HIV—310 RunModuleH
Injektionszeit:	je nach PCR Produkt 15 bzw. 30 Sek.
Injektionsspannung:	2 kV
Laufspannung:	13.5 kV
Lauftemperatur:	50° C
Laufzeit:	40-46 Min., je nach Fragmentlänge

3.9 Sequenz-Analyse

3.9.1 Sequenzbearbeitung

Die HIV-Genotyping System Software fasste zunächst die sieben verschiedenen Sequenzen einer Probe (Fragment A, B, C, D, F, G, H) zu einem Projekt zusammen und alinierte sie mit einer HIV-Referenzsequenz (HIV-1 HxB2). Fragmente, die nicht in voller Länge gelesen werden konnten oder deren Signal zu schwach war, konnten bearbeitet oder aus diesem Projekt entfernt werden. Die entstandene Sequenz wurde manuell editiert. Wichtig waren vor allem die Positionen, die mit einer Resistenzmutation gegen ein antiretrovirales Medikament assoziiert sind und an denen oftmals mehr als ein Genotyp in der Sequenz sichtbar war. In dem System waren die resistenzassoziierten Mutationen, die in der Los Alamos Datenbank verzeichnet waren, erfasst und wurden beim Auftreten angezeigt. Die Sequenz wurde als Textdatei im Fastaformat gespeichert.

3.9.2 Sequenzinterpretation

Zur Kontrolle der resistenzassoziierten Mutationen in den vorliegenden Sequenzen und ihrer Bewertung stand die Stanford HIV RT and Protease Sequence Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) zur Verfügung. Dort wurde den resistenzassoziierten Mutationen je nach ihrer Relevanz für die Resistenz gegenüber einem bestimmten Medikament ein Zahlenwert zugeordnet. Nach Addition dieser Werte für jedes einzelne Medikament wurde eine Aussage über die Resistenz gemacht. Es wurde unterschieden zwischen „keine Resistenz“, „geringe Resistenz“, „intermediäre Resistenz“ und „hohe Resistenz“. Die Ermittlung des Subtyps konnte ebenfalls mit Hilfe der „*HIV-Drug-Resistance-Database*“-Stanford durchgeführt werden. Die erhaltene Sequenz des *pol*-Genbereichs wurde verglichen mit allen in der Datenbank erfassten HIV-Sequenzen und es wurde die prozentuale Übereinstimmung zum nächst ähnlichen Subtyp angegeben. Die Sequenzen wurden auch mit dem Programm geno2pheno (<http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl>) analysiert. Mit dem Programm geno2pheno wurde eine phänotypische Resistenz mit Hilfe der genetischen Information von Protease und Reversen Transkriptase vorhergesagt. Geno2pheno ist ein binäres Vorhersageprogramm, was durch Anwendung unterschiedlicher Algorithmen einen virtuellen Phänotyp und damit auch eine Medikamentenresistenz ermittelt. Zusätzlich konnte auch mit Hilfe dieses Programms der Subtyp des HIV-1 Stamms erfasst werden. Um Verwandtschaftsgrade der einzelnen Virusstämme untereinander darstellen zu können wurden phylogenetische Stammbäume mit Hilfe des Programms ClustalX erstellt.

3.10 DNA-Standardmethoden

- ◆ **Agarose-Gelelektrophorese:** Damit ließen sich Nukleinsäuren verschiedener Länge aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität im elektrischen Feld voneinander trennen. Durch gleichzeitiges Auftrennen eines definierten Längenstandards kann die Fragmentgröße des amplifizierten Produkts ermittelt werden, da ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Fragmentgröße besteht. Die Konzentration des Agarosegels richtet sich immer nach der Größe des Fragments.
- ◆ **Ethidiumbromidfärbung:** Um die DNA Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) angefärbt. Unter kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=250-310$ nm) wurden die DNA-Banden mittels einer Bilddokumentationsanlage photographiert.
- ◆ **PCR-Produktaufreinigung:** Unspezifische Produkte wie z.B. Oligonukleotid-dimere oder überschüssige Nukleotide im Reaktionsansatz wurden mittels des *Qiaquick PCR Purification Kit* von Qiagen entfernt.
- ◆ **Quantifizierung von DNA:** Genauere Bestimmungen der DNA Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop-Spectrophotometers (PEQLAB, Erlangen) durchgeführt.

3.11 Bakterienkultur und -Methoden

3.11.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Für die Transformation wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. Um die Bakterien kompetent zu machen, wurden 150 ml LB-Medium mit 5 ml frischer Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4° C und 960xg für 5 min zentrifugiert, in 30 ml kaltem TFB-I resuspendiert und noch mal bei 4° C und 960xg für 5 Min. zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 2 ml eiskaltem TFB-II resuspendiert. Die Bakterien konnten dann direkt für die Transformation eingesetzt oder in Aliquots aufgeteilt bei -80° C gelagert werden.

3.11.2 Transformation kompetenter Bakterien

100 µl der kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden mit ca. 1 ng Plasmid-DNA vermischt, für 20 Min. auf Eis gestellt, 1 Min. bei 42° C inkubiert und noch mal für 3-5 Min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden sie bei 37° C unter Schütteln für 30 Min. inkubiert, um das Resistenzgen zu exprimieren. Die Transformanten wurden dann 20 Sek. bei 960xg zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 20 µl verworfen und das resuspendierte

Pellet auf antibiotikumhaltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.11.3 Langzeitlagerung von Bakterien

Von einer dichten Bakterienvorkultur wurde 1 ml entnommen, mit 500 µl 50% Glycerin vermischt (Endkonzentration: 16,7%) und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

3.11.4 Kulturen zur Plasmidisolierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide verfügten über ein Resistenzgen, so dass durch Zugabe von 100 µg/ml Antibiotikum (Ampicillin = Amp) sowohl in Flüssigmedium als auch in Agarplatten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden konnte. Zur analytischen Plasmidisolation wurden 5 ml LB-Amp-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (SARSTEDT) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Rotationsinkubator bei 37° C wachsen gelassen. Kulturen für die präparative Plasmidisolierung wurden in 200 ml LB-Amp-Medium in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angesetzt und über Nacht bei 37° C unter Schütteln inkubiert.

3.11.5 Plasmidpräparationen

Präparative und analytische Plasmidisolierung (Mini-, Maxi-, Gel-Extraktionen, PCR-Produkt-aufreinigungen) wurden mit Reagenzsystemen der Firma QIAGEN und der Firma MARLIGEN Biosciences (USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Sie basierten auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim & Doly (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzel). Die DNA wurde zum Schluss je nach weiterem Gebrauch entweder in Ampuwa-Wasser oder EB-Puffer aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde spektrometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten in einem UV-VIS-Spektrometer (BIORAD) oder mittels des Nanodrop Spectralphotometers (PEQLAB, bestimmt.

3.11.6 Kolonie-PCR zur Kontrolle des Inserts

Durch eine Kolonie-PCR einzelner Klone mit den Oligonukleotiden Pla F und Pla R, die in der *Multiple Cloning Side* des Vektors binden und anschließender Sequenzierung konnte die Sequenz des entstandenen Plasmids überprüft werden.

Kolonie-PCR Ansatz:

		Endkonz.:
Produkt aus der Plasmidpräparation	1 µl	
10x PCR-Puffer	10 µl	1 x
dNTP-Lösung (je 10 mM)	2 µl	0,2 mM
„Hot start“-Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl	5 U
Pla F 10 µM	1 µl	0,1 µM
Pla R 10 µM	1 µl	0,1 µM
5x „Q-Solution“	20 µl	1 x
H ₂ O Ampuwa	ad 100 µl	

PCR-Bedingungen:

Aktivierung der Polymerase	95° C	12 Min.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	20 Sek.	} X40
Anlagerung der Oligonukleotide	50° C	20 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	45 Sek.	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	30 Sek.	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72° C	10 Min.	
Kühlung	4° C		

3.12 Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR

Da für die sehr sensitive Methode der Echtzeit-PCR Standardplasmide mit bzw. ohne die zu untersuchende Mutation nötig waren, mussten Plasmide hergestellt werden, die die HIV Zielregion und zudem nur an der zu untersuchenden Aminosäureposition eine Mutation aufwiesen. Zunächst wurde ein Wildtypplasmid der Zielregion hergestellt. Danach konnte mit Hilfe der sequenzspezifischen Mutagenese Plasmide für die Proteasemutation V82A, die Reverse Transkriptasemutationen K103N und die K70R hergestellt werden.

3.13 Herstellung eines Plasmids mit integrierter Wildtyp Protease und Reverser Transkriptase

Ein durch die oben beschriebene „nested PCR“ 1505 bp großes Fragment, das für die Protease und die RT kodiert, wurde frisch hergestellt. Mit Hilfe des Qiagen *UA-Cloning Kits* und dem darin enthaltenen bereits linearisierten pQE30-UA Vektor konnte wie im Protokoll beschrieben eine Ligation zwischen Plasmid und PCR-Produkt durchgeführt werden.

Ligations-Ansatz:

PQE-30 UA Vektor (50 ng/μl)	1 μl
PCR Produkt	2 μl
H ₂ O	2 μl
2x Ligations Mastermix	5 μl

Durchführung:

Die oben beschriebenen Bestandteile werden in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben, vorsichtig gemischt und anschließend bei 16° C für 2 Stunden inkubiert. Danach können die entstandenen Plasmide transformiert oder bei -20° C gelagert werden.

3.14 *In vitro* Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe des „*QuikChange® Site-Directed Mutagenesis System*“ (Stratagene, La Jolla, USA) eingeführt. Die Oligonukleotide wurden nach der Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

berechnet, wobei %GC für den GC-Gehalt und %*mismatch* für den Gehalt an nicht komplementären Basen steht. Das zu mutierende Plasmid wurde dann mit zwei zueinander überwiegend komplementären Oligonukleotiden, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion nach folgendem Schema eingesetzt:

Reaktionspuffer	5 μl
Plasmid (50 ng/μl)	1 μl
3' Oligonukleotid (100 μM)	1 μl
5' Oligonukleotid (100 μM)	1 μl
dNTP-Mix	1 μl
<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase	1 μl
H ₂ O	ad 50 μl

PCR-Bedingungen:

Denaturierung der DNA-Matrize	95° C	30 Sek.	} x 12
Denaturierung der DNA-Matrize	95° C	30 Sek.	
Oligonukleotidanlagerung	55° C	1 Min.	
Extension der Oligonukleotide	68° C	12 Min.	
Extension der Oligonukleotide	68° C	10 Min.	

Die PCR-Bedingungen wurden an die Sequenz der Oligonukleotide und die Größe des Plasmids angepasst. Dabei wurde das Plasmid denaturiert und die Oligonukleotide konnten sich anlagern. Die *PfuTurbo* DNA Polymerase vervollständigte die Plasmidsequenz mit einem daraus resultierenden nicht geschlossenen zirkulären Strang. Diese mutierten Stränge blieben bei der anschließenden Restriktion mit *DpnI* (1 µl *DpnI*, 1 h, 37° C) erhalten, da dieses Enzym nur die parentalen, methylierten, nicht mutierten Plasmidstränge verdaut. Für die Transformation in *E. coli* wurden jeweils 1 µl des Ansatzes und 150 µl XL1-Bakterien verwendet. Mit dieser Methode wurden ein Plasmid mit der Mutation K103N unter der Verwendung der Oligonukleotide SDM F K103N und SDM R K103N, ein Plasmid mit der Mutation K70R unter der Verwendung der Oligonukleotide SDM F K70R und SDM R K70R und auch ein Plasmid mit der V82A hergestellt.

3.15 Minderheitendetektion mittels Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR erlaubt, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen PCR Methoden, eine Quantifizierung der PCR-Produkte. Hierbei kommen entweder ein in doppelsträngige DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff oder fluoreszenzmarkierte Sonden zum Einsatz. Zusätzlich wird ein entsprechender Standard eingesetzt, um die genaue Menge des entstandenen Produkts zu ermitteln. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass durch die Detektion der Fluoreszenz während der gesamten Reaktion eine ständige Beobachtung des Reaktionsverlaufs gegeben ist, daher spricht man auch von einer Echtzeit-PCR (engl.: *real-time* PCR). Bei dieser Echtzeit-PCR verbinden sich Farbstoffe mit der neu gebildeten DNA (nicht jedoch mit dem Oligonukleotid oder den freien DNA-Bausteinen). In der ersten Phase der PCR steigt die Produktmenge nur langsam an, da ein suboptimales Verhältnis von Oligonukleotiden, Polymerase und Ausgangsprodukt vorliegt. In der zweiten Phase kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Produkts wo hingegen in der 3. Phase das Wachstum aufgrund einer Hitzedegeneration der Polymerase, des Verbrauchs des Substrats und der Hemmung durch das Produkt stagniert. Die Echtzeit-PCR macht sich zu Nutze, dass diese drei Phasen kontinuierlich durch die Fluoreszenz verfolgt werden können. Sobald die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt wird der erste Zyklus, bei dem der Schwellenwert des Hintergrundsignals überwunden wird als so genannter CT-Wert (*Threshold Cycle*= Schwellenwert-Zyklus) erfasst und ermöglicht einen Vergleich unterschiedlicher Proben miteinander bzw. eine genaue Quantifizierung der Virusmenge durch einen mitgeführten Standard mit definierter Virusmenge. Außerdem ist diese Methode hoch sensitiv, was daher den Nachweis schon geringster Mengen DNA ermöglicht. Um in Virusmischpopulationen, eine Minderheitenpopulation zu detektieren und deren Anteil an der Gesamtpopulation zu

ermitteln wurde die Methode in dieser Arbeit verwendet. Dazu wurden unterschiedliche Fluoreszenz-Nachweismethoden genutzt.

3.15.1 SYBR-Green

Die einfachste Methode zum Nachweis von Echtzeit-PCR Produkten ist SYBR Green I, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der zum Nachweis von doppelsträngiger DNA genutzt wird. SYBR Green I bindet doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$. Weitere, wenn auch deutlich schwächere, Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei etwa 300 nm und 370 nm. Durch eine nach der Amplifikation durchgeführte Schmelzkurve, die die Schmelztemperatur des entstandenen Produkts misst, kann die Spezifität des Produkts bzw. andere Nebenprodukte nachgewiesen werden.

3.15.2 TaqMan-Sonden

Eine Möglichkeit, während der PCR gezielt nur das gewünschte DNA-Produkt nachzuweisen, bieten zum Beispiel die TaqMan-Sonden. Dies sind kurze DNA-Stücke, die überwiegend mit einem mittleren Bereich der Ziel-DNA hybridisieren. Sie tragen an ihrem einen Ende einen Reporterfarbstoff (R) und am anderen einen Quencher (Q). Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage, die TaqMan-Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, welcher somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an Reporterfarbstoff steht daher für einen synthetisierten DNA-Strang – daher kann man mit TaqMan-Sonden tatsächlich jederzeit die Menge amplifizierter DNA messen.

3.15.3 Hybridisierungs-Sonden

Hybridisierungs-Sonden bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die benachbart an die DNA hybridisieren können. Sie tragen an den aufeinander zugerichteten Enden zwei Fluorophore, die über Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) miteinander interagieren können. Dabei überträgt der kurzwelligere Farbstoff Fluorescein, der mittels blauen Licht angeregt wird, seine Energie strahlungslos an den langwelligeren Farbstoff LightCycler® Red. Dieser gibt ein rotes Licht ab, das detektiert wird. Das Signal kommt also nur zustande, wenn beide Sonden in räumlicher Nähe binden. Bei einem Überschuss an Sonden ist die Signalfluoreszenz proportional zur Menge der vorliegenden Zielsequenz. Die Effizienz der Hybridisierung hängt von der tatsächlichen Homologie zur Zielsequenz ab. Zwar binden auch Sonden die einen oder mehrere Basenunterschiede zur Zielregion aufweisen, aber die

Festigkeit dieser Verbindung ist herabgesetzt. Dies nutzt man zur Diskriminierung von Punktmutationen. Das Sondenpaar ist nur bei einer der beiden Mutationsvarianten hundertprozentig homolog. Wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurve mit stetig ansteigender Temperatur bei geringem Temperaturinkrement durchgeführt, schmelzen die Sonden bei dem nicht hundertprozentig passenden Matrize früher ab als bei der, den Sonden komplementären Zielsequenz. Wenn kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird, kann der genaue Schmelzpunkt unterschiedlicher Produkte ermittelt werden. So ist es auch möglich, Mischungen von z.B. Virusstämmen mit und ohne Mutation und deren anteiliges Verhältnis zu bestimmen.

3.15.4 Quantifizierung der Standardplasmide

Um alle Standardplasmide miteinander vergleichbar zu machen, musste die eingesetzte Plasmidmenge gleich sein. Zur Abgleichung der Plasmide untereinander wurde eine real-time PCR verwendet, bei der die Ampicillin-Kassette der Plasmide als Zielregion amplifiziert wurde. Ein Plasmid mit definierter Kopienanzahl wurde so verdünnt, dass eine Standardreihe mit 100, 1.000, 10.000 und 100.000 Kopien zur Verfügung stand. Durch den Vergleich der CT-Werte bei der Amplifikation konnte die Konzentration der bisher nicht quantifizierten Plasmide bestimmt werden.

PCR-Ansatz:

Plasmid	2 µl
Oligonukleotid 1 amp	0,5 µM
Oligonukleotid 2 amp	0,5 µM
Puffer	2 µl
Sybr-Green (1/1000)	2 µl
dNTPs (10mM)	0,4 µl
Platinum Taq	0,25 µl
Mg ²⁺ (50mM)	1,6 µl
H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Bedingungen:

Aktivierung der Polymerase 95° C 1 Min.

„Touch Down“:

Die Anlagerungstemperatur wurde in jedem Zyklus 1° C niedriger, bei einer Starttemperatur von 68° C und einer Zieltemperatur von 58° C:

Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	1 Sek.	} x10
Anlagerung der Oligonukleotide	68-58° C	5 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	70° C	10 Sek.	

Vermehrung des spezifischen Produkts:			
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	1 Sek.	} x 30
Anlagerung der Oligonukleotide	58° C	5 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	72° C	10 Sek.	
Extension der Oligonukleotide	79° C	20 Sek.	
Schmelzkurve:			
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	15 Sek.	
Langsamer Temperaturanstieg 0,1° C/Sek.			
dauerhafte Messung der Fluoreszenz bis	75° C		
Kühlung	40° C	30 Sek.	

3.15.5 Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT

Da die Methode der Direktsequenzierung nur Populationen detektieren kann, die mehr als 20% der Gesamtpopulation ausmachen, ist es für die Aufklärung von Evolutionsprozessen wichtig, auch Quasispezies, die eine Minderheitenpopulation ausmachen, zu detektieren. Es wurde ein Assay zum Minderheitennachweis von Viruspopulationen mit einer Mutation an Aminosäureposition 70 der RT entwickelt. Die resistenzassoziierte Mutation K70R ist eine der ersten Mutationen, die im sogenannten Thymidin-Analoga-Resistenzpfad auftritt. Da in benachbarter Position zu der Aminosäure 70 ebenfalls häufig resistenzassoziierte Mutationen auftreten, konnte die später beschriebene Methode der oligonukleotidspezifischen PCR nicht angewendet werden, da durch störende Mutationen in benachbarten Regionen keine ausreichende Spezifität erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurden Hybridisierungs-Sonden eingesetzt, die wie oben bereits erläutert, Punktmutationen einzelner Produkte innerhalb der Schmelzkurve diskriminieren können. Da aber auch hier benachbarte Mutationen das Ergebnis verfälschen würden, mussten die Sonden so entworfen werden, dass sogenannte „*locked nucleic acids*“ (LNAs) an drei Positionen eingebaut wurden. Diese LNAs sind modifizierte Nukleotide, die aufgrund ihrer geänderten Struktur zu einer starken DNA Bindung führen. So gelingt es, ein spezifisches Schmelzverhalten nur von dem Vorkommen eines Wildtyps oder der resistenzassoziierten Mutation an Position 70 abhängig zu machen. Es wurde eine Sonde gewählt, die ebenfalls als 3' Oligonukleotid fungierte und eine zweite Sonde, die mit dem komplementären Nukleotidstrang hybridisieren konnte. Anhand der Schmelzkurve konnte das Verhältnis von Wildtyp- und Mutantenpopulationen in einer Probe bestimmt werden. Da diese Methode neu entwickelt wurde, wird dieser Assay ausführlicher im anschließenden Ergebnisteil erläutert. Unter den folgenden Bedingungen konnte eine Sensitivität von 5% erreicht werden.

Methoden

Ansatz:	1 x
Pre-Mastermix (LightCycler DNA Hybprobe Masterkit)	2 µl
MgCl ₂ (25 µM)	2,4 µl
3' Oligonukleotid+Sonde 1 K70R iLC (10 µM)	0,8 µl
Sonde 2 K70R s.short (10 µM)	0,8 µl
5' Oligonukleotid P2 neu (10 µM)	0,8 µl
DNA Matrize	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-PCR:

Aktivierung der Polymerase	95° C	10 Min.	} x 42
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	10 Sek.	
Anlagerung und Extension der Oligonukleotide	55° C	15 Sek.	
Elongation des Templates	72° C	15 Sek.	
Schmelzkurve:			
Aufschmelzen der Produkte	95° C	20 Sek.	
Zusammenlagerung der Doppelstränge	40° C	20 Sek.	
Langsamer Temp. Anstieg 0,2° C/Sek. dauerhafte Messung der Fluoreszenz bis 70°C			
Kühlung	40° C	30 Sek.	

Alle Minderheitenassays wurden durch Plasmidmischungen von Wildtypplasmiden und entsprechenden Plasmiden mit Mutation validiert. Anschließend wurde die Sensitivität der jeweiligen Methode bestimmt.

3.15.6 Detektion von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103

Zur Detektion einer Minderheit der NNRTI-Schlüsselmuation an Aminosäureposition 103 in der RT wurde eine PCR zur Diskriminierung von Wildtyp und Mutante entwickelt. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert und deren Sensitivität verglichen. Das Prinzip beider Methoden basiert auf einer spezifischen Oligonukleotidbindung. Mit dem ersten Oligonukleotidpaar nach (Metzner et al., 2005) wurden diejenigen Viren amplifiziert, die an Position 103 eine Mutation aufwiesen. Mit dem anderen Oligonukleotidpaar wurden die Stämme nachgewiesen, die einen Wildtyp bezüglich dieser Aminosäure besaßen. Dieser Ansatz wurde mit SybrGreen wie folgt durchgeführt:

Methoden

PCR-Ansatz:	1 x
Pre-Mastermix (LightCycler Sybrgreen Masterkit)	2 µl
MgCl ₂ (25µM)	2,4 µl
5' Oligonukleotid MINK103/103N (10µM)	0,4 µl
3' Oligonukleotid Mpol 3002 (10µM)	0,4 µl
DNA Template	5 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-PCR:

Aktivierung der Polymerase	95° C	10 Min	
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	20 Sek.	} x 50
Anlagerung und Extension der Oligonukleotide	60° C	10 Sek.	
Elongation des Templates	72° C	20 Sek.	
Schmelzkurve:			
Aufschmelzen der Produkte	95° C	1 Sek.	
Zusammenlagerung der Doppelstränge	55° C	20 Sek.	
Langsamer Temperaturanstieg 0,2° C/Sek.			
dauerhafte Messung der Fluoreszenz bis	95° C		
Kühlung	40° C	30 Sek.	

Eine weitere Versuchsreihe für die Position 103 der Reversen Transkriptase wurde mit einem Oligonukleotidpaar nach (Lecossier et al., 2005) auf dem LC 2.0 adaptiert und etabliert. Als Nachweismethode wurde eine Taqman-Sonde gewählt. Hier wurde in einem ersten Ansatz die Gesamtviruspopulation der Patientenproben mit Hilfe des ersten Oligonukleotidpaars K103N LMF1 und K103N LMR1 gemessen und anhand einer Standardreihe (1 Mio Kopien, 100.000 Kopien, 10.000 Kopien, 1.000 Kopien) des Wildtyp-plasmids und eines Plasmids mit Mutation an Aminosäureposition 103 der RT quantifiziert. Wenn bei den Mutanten die Aminosäure Asparagin durch das Kodon AAC entstanden war, wurde in einem weiteren Ansatz das Oligonukleotidpaar K103N LMF1 und K103N LM4rev eingesetzt, und wenn das mutierte Asparagin durch das Kodon AAT entstanden war, wurde das Oligonukleotidpaar K103N LMF1 und K103N LM6rev verwendet. Durch eine Quantifizierung anhand des Standards wurde die Menge an Viruspopulation mit einer Mutation K103N gemessen. Der Anteil der Viren mit Mutation an Position 103 konnte durch den Quotienten von der ermittelten Menge Mutante zu der Gesamtmenge berechnet werden.

Methoden

$$\text{Anteil Mutante (\%)} = \frac{\text{Mutantenmenge (mit Oligonukleotidpaar 2 ermittelt)}}{\text{Gesamtmenge (mit Oligonukleotidpaar 1 ermittelt)}} \times 100$$

PCR-Ansatz:	1 x
Pre-Mastermix (LightCycler Taqman Masterkit)	4 μ l
MgCl ₂ (25 μ M)	1,6 μ l
Sonde K103N (10 μ M)	0,4 μ l
3' Oligonukleotid (10 μ M)	0,4 μ l
5' Oligonukleotid (10 μ M)	0,4 μ l
DNA Template	5 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-PCR:

Aktivierung der Polymerase	95° C	10 Min.	} x 45
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	20 Sek.	
Anlagerung und Extension der Oligonukleotide	55° C	1 Min.	
Kühlung	40° C	30 Sek.	

3.15.7 Detektion von Minderheitenpopulationen in der Protease

Die Mutation an Position 82 der Protease ist eine Schlüsselmutation bei der Entwicklung von Resistenz gegenüber dem Proteaseinhibitor Lopinavir. Zum Nachweis von Minderheitenstämmen mit einer Mutation an Position 82 der Protease wurde ein Assay etabliert, der es möglich machte, in Patientenproben Mischpopulationen von Mutante oder Wildtyp sicher nachzuweisen. Dazu wurden, ähnlich wie in der bereits oben beschriebenen Methode zum Nachweis der K103N, zwei Oligonukleotidpaare nach (Hance et al., 2001) genutzt, um zum einen sowohl Mutante und Wildtyp an dieser Position durch das Oligonukleotidpaar (V82A PRF3, V82A PRR1) zu amplifizieren und mit einem zweiten Oligonukleotidpaar (V82AM2mut und V82A PRR1) nur solche Virusstämme zu vervielfältigen, die eine Mutation aufwiesen. Als Ausgangsprodukt diente ein erstes RT-PCR Produkt, das mit den Oligonukleotiden 1 Res und 2 Res amplifiziert wurde. Durch eine Standardreihe von Plasmiden mit und ohne Mutation, die mit beiden Oligonukleotidpaaren durchgeführt wurde, konnte aufgrund des CT-Werts die Virusmenge quantitativ erfasst werden. Der Anteil der Viren mit Mutation an Position 82 konnte durch den Quotienten von der ermittelten Menge Mutante zu der Gesamtmenge berechnet werden. Zunächst wurde dieser Versuch mit SybrGreen etabliert. Dies erzielte aber nicht die nötige Sensitivität, daher

Methoden

wurde für weitere Experimente eine TaqMansonde (Sonde V82A) eingesetzt. Der Assay wurde mit unterschiedlichen $MgCl_2$ -, Oligonukleotidkonzentrationen und Sondenmengen etabliert und final unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz:	1 x
Pre-Mastermix (LightCycler TaqMan Masterkit)	4 μ l
$MgCl_2$ (25 μ M)	4 μ l
Sonde V82A (10 μ M)	0,5 μ l
3' Oligonukleotid (10 μ M)	0,4 μ l
5' Oligonukleotid (10 μ M)	0,4 μ l
DNA Template	5 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-PCR:

Aktivierung der Polymerase	95° C	10 Min.	} x 45
Denaturierung des DNA-Doppelstrangs	95° C	10 Sek.	
Anlagerung und Extension der Oligonukleotide	55° C	1 Min.	
Kühlung	40° C	30 Sek.	

4 Ergebnisse

4.1 Detektion resistenzassoziierter Mutationen durch Direktsequenzierung

4.1.1 Amplifikation und Sequenzierung der Protease und der Reversen Transkriptase des *pol*-Gens von HIV-1

Die Isolierung der HIV-1 RNA aus Serum mit unterschiedlicher HI-Viruslast erfolgte nach dem entwickelten Standardprotokoll. Zur Amplifikation der Protease (PR) und der Reversen Transkriptase (RT) wurde als Standardmethode eine „*One step*“ RT-PCR mit anschließender „*Nested*“ PCR durchgeführt. Obwohl mit dieser „*in house*“-Methode eine hohe Sensitivität erreicht wurde, konnte jedoch nicht bei allen untersuchten Patientenproben ein Produkt hergestellt werden. In diesem Fall wurde die Amplifikation mit einem kommerziellen Kit der Firma Abbott in einer zwei Schritt Reaktion durchgeführt. Ein Grund hierfür war der Einsatz unterschiedlicher Primer in den verschiedenen Systemen. Die Oligonukleotide können bei den individuell unterschiedlichen Patientenstämmen verschiedene Affinitäten zur Zielregion aufweisen. Obwohl die Oligonukleotidbindestelle in einer konservierten Region des Genoms gewählt wurde, können bei den einzelnen Virusstämmen Sequenzvariationen vorliegen, die eine Oligonukleotidbindung verhindern. Dies führt vor allem bei ungewöhnlichen Subtypen zu einem erhöhten Risiko, da diese im Vergleich zum in Deutschland vorherrschenden Subtyp B vermehrt Sequenzunterschiede aufweisen.

4.1.1.1 „In house“-System

Die Amplifikation der PR und RT von HIV-1 erfolgte mit dem „*in house*“-System durch eine *One-Step* RT-PCR mit anschließender *Nested* PCR. Die *One-Step* RT-PCR wurde nach dem Standardprotokoll mit den Oligonukleotiden 1 Res und 2 Res durchgeführt. Dabei entstand ein 2377 nt großes Produkt aus dem *pol*-Gen Bereich, welches sich nur bei Proben über elektrophoretische Auftrennung nachweisen ließ, bei denen die RNA-Isolierung mit einer hohen Ausbeute gelang. In der zweiten PCR (*Nested* PCR) wurde ein 1464 bp großes Produkt amplifiziert und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe Abb. 7). Die Oligonukleotidkonzentration und die MgCl₂-Konzentration wurden für beide PCRs optimiert.

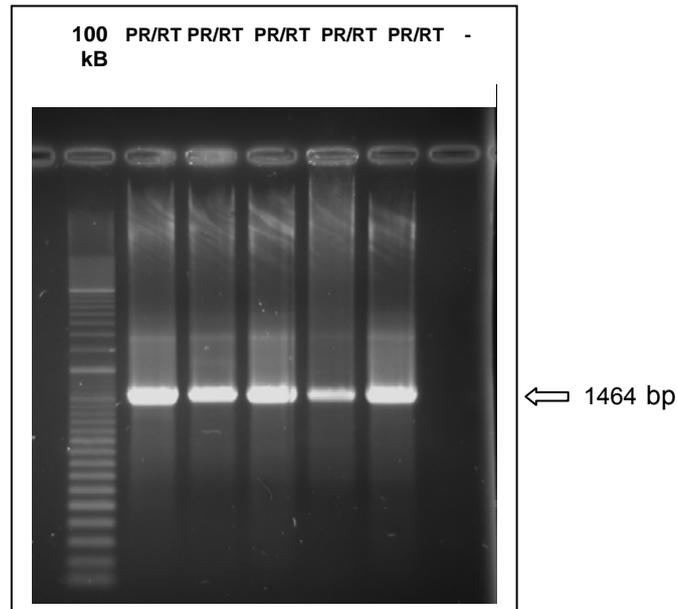


Abb. 7: Nachweis der PCR-Produkte von Protease und Reversen Transkriptase des *pol*-Gens
PCR-Produkt von 5 Proben und einer Negativkontrolle nach *One step* RT PCR und anschließender *Nested* PCR, elektrophoretisch aufgetrennt in einem 1%igen Agarosegel.

4.1.1.2 Ermittlung der Nachweisgrenze der Direktsequenzierung

Die PCR-Produkte der PR/RT wurden nach einer im Methodenteil beschriebenen Sequenzreaktion aufgereinigt. Die Aufreinigung mittels Isopropanol-Natriumacetat Fällung (Abb. 8) brachte kein zufrieden stellendes Ergebnis. Quasispezies konnten aufgrund störender Fluoreszenzsignale nicht detektiert werden, so dass eine bessere Methode der Aufreinigung zur Sensitivitätssteigerung gewählt werden musste. Dazu wurde die im Methodenteil beschriebene Aufreinigung mittels Gelbettsäulen durchgeführt. Durch diese Art der Aufreinigung konnte eine Sensitivitätssteigerung im Nachweis von Minderheiten in Mischpopulationen erreicht werden, die dann bis zu 25% erkannt werden konnten. Diese Grenze von 25% wurde ermittelt, indem zwei bereits sequenzierte PCR Produkte, die 100% Wildtyp bzw. 100% einer Mutante an Position 103 der RT zeigten, miteinander gemischt und sequenziert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Ergebnisse

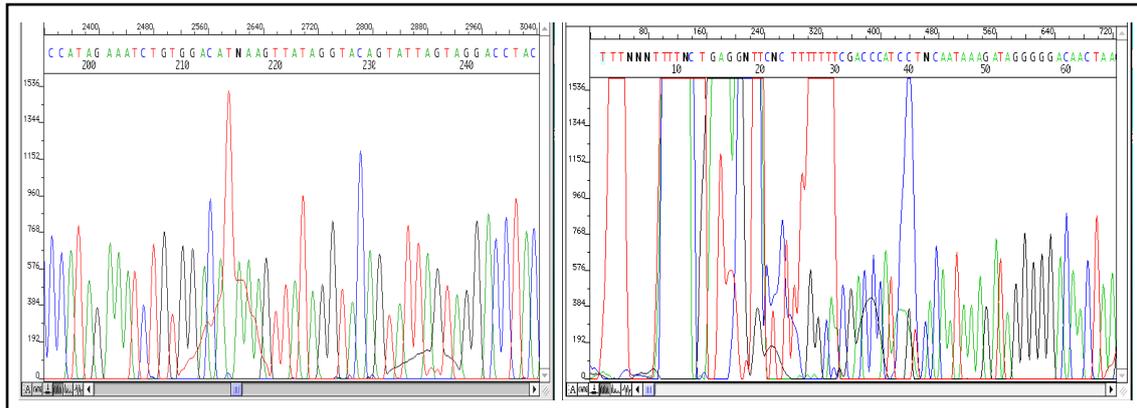


Abb. 8: Ergebnis der Sequenzierung von Patientenproben nach der Isopropanol-Natriumacetat Fällung

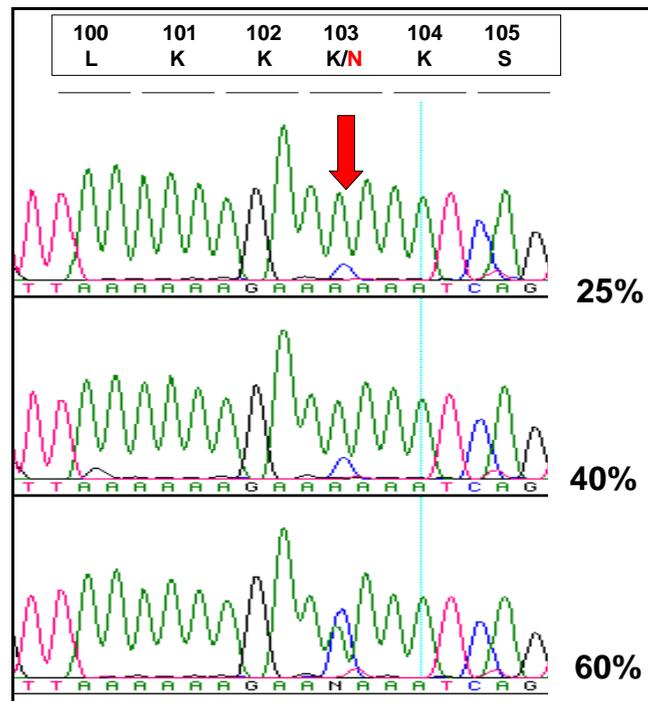


Abb. 9: Ermittlung der Nachweisgrenze der Direktsequenzierung

Darstellung der Sequenz, die für die Aminosäurepositionen 100-105 der RT kodiert. In den drei übereinander dargestellten Sequenzfragmenten liegen in der ersten Zeile die Sequenzergebnisse einer Mischung aus 25% PCR-Produkt mit Mutante 75% Wildtyp PCR-Produkt, in der zweiten Zeile 40% PCR-Produkt mit Mutante 60% Wildtyp PCR-Produkt, beziehungsweise in der letzten Zeile 60% PCR-Produkt mit Mutante 40 % Wildtyp PCR-Produkt vor. Dieser hinzugefügte Stamm mit mutierter K103N unterschied sich an der Aminosäureposition 103 in der dritten Base von der Sequenz der ursprünglichen Probe.

4.1.2 Evolution von Virusvarianten unter geänderten selektiven Druck in einer Therapiepause

Um die Entwicklung des vorherrschenden Virusstamms in einer Therapiepause bei therapieerfahrenen, chronisch HIV-1 infizierten Patienten anhand von Sequenzunterschieden der vorherrschenden Virusstämme nachvollziehen zu können, wurde in zwei unterschiedlichen Kollektiven ein Mutationsprofil vor, in und nach der Pause bzw. nur vor und in der Therapiepause jedes Patienten analysiert. Die differenzierte Betrachtung einzelner

Mutationen und deren Entwicklung kann Aufschluss über die Entwicklung des prädominanten Virus innerhalb der Pause geben. Es wären auch Unterschiede in der Entwicklung von Mutationen denkbar, die mit Resistenz gegenüber verschiedenen Stoffklassen assoziiert sind. Daher werden im Folgenden die resistenzassoziierten Mutationen nach Stoffklassen getrennt analysiert. Die resistenzassoziierten Mutationen wurden nach den Richtlinien der Internationalen Aids Society USA (IASUSA) bewertet. Zusätzlich erfolgte eine Bewertung der Resistenzprofile mit den Interpretationsprogrammen geno2pheno und dem Stanford HIV Resistenzbewertungsprogramm.

4.1.2.1 Evolution von Virusstämmen stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten vor, in und nach einer Therapiepause (Patientenkollektiv 1)

Bei chronisch infizierten HIV-Patienten, die schon über einen langen Zeitraum mit antiretroviralen Medikamenten behandelt wurden, sind Stämme mit hoher Kreuzresistenz entstanden, die nur noch geringe Sensitivität gegenüber Medikamenten zeigen. Durch eine Therapiepause ändert sich aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks, der vorherrschende Virusstamm im Blut. Aufgrund der höheren Fitness wird ein Virus mit Wildtypsequenz als dominantes Virus im Blut erwartet. Ob dieses Wildtypvirus auftritt, wie es sich entwickelt hat und ob ein Zusammenhang mit klinischen und virologischen Daten besteht, sollte untersucht werden. In einer retrospektiven Analyse wurden 14 multipel vorbehandelte Patienten, die eine Therapiepause durchführten und anschließend wieder eine neue Therapie begannen, untersucht. Die Evolution der Resistenzprofile der Viruspopulationen dieser Patienten wurde vor, in und nach der Pause verfolgt. Zusätzlich wurde der Einfluss anderer klinischer und virologischer Parameter auf die Evolution der Resistenzen ermittelt. Anschließend wurde bestimmt, ob eine Korrelation zwischen einzelnen Parametern und dem Erfolg einer wieder einsetzenden Therapie besteht. Die Genotypen (G), die Vortherapien (T), die Viruslast (VL) und die CD4⁺-Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeiten wurden ermittelt. Daten vor der Therapiepause bekamen einen Index mit der Zahl 0, alle Daten aus der Therapiepause einen Index 1 und nach der Pause unter einer neuen Therapie den Index 2. Weitere Folgeproben wurden im Index chronologisch mit 3, 4, 5 und 6 durchnummeriert.

4.1.2.2 Klinische Daten der Patienten in Therapiepause

13 der 14 Patienten waren männlich, Patient #1 war eine Frau. Die mediane Dauer der Pause betrug 80,5 Tage (von 23 bis 175 Tage). Alle Patienten bis auf #3, der NNRTI-naiv war, waren mit PIs, NRTIs und NNRTIs vorbehandelt. Im Median waren in den Vortherapien 4 PIs (von 1- 7), 6 NRTIs (von 4-7) und 1 NNRTI (von 1-2) angewandt worden. Keiner dieser Patienten bekam vor der Therapiepause einen Fusionsinhibitor. Alle 14 nahmen seit mindestens vier Jahren eine HAART ein und hatten mindestens fünf verschiedene

Medikamente aus mindestens 2 Stoffklassen vor der Pause eingenommen. Bei allen Patienten hatten bereits mindestens zwei Therapieregime versagt, wobei mindestens eins dieser Regime einen PI beinhaltete. Die Viruslast zu Beginn der Therapiepause lag bei allen höher als 2000 Kopien/ml. Die unterschiedlichen Gründe, die zum Abbruch der Therapie führten, waren virologische Resistenz, Toxizität oder die persönliche Entscheidung des Patienten. Detaillierte Patientendaten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

#	T ₀	T ₂	Jahre nach HIV Erstdiagnose	Jahre Therapie vor Therapiepause	Alter (Jahren)	PIs vor TP	NRTIs vor TP	NNRTIs vor TP	Dauer TP (Tage)	Grund für TP
1	ABC, 3TC, NVP, LPV/r	ABC, 3TC, NVP, LPV/r	12	5	40	5	4	1	175	Tuberkulose
2	ddl, 3TC, ABC, NVP	3TC, TDF, APV, RTV, LPV/r	14	14	60	7	6	1	66	Resistenz
3	ABC, AZT, 3TC, LPV/r	TDF, 3TC, IDV, LPV/r	6	5	40	3	4	0	79	Resistenz
4	ddl, d4T, ABC, LPV/r	AZT, 3TC, ABC, TDF, LPV/r	7	5	43	5	6	1	42	Toxizität
5	ddl, ABC, NVP	d4T, ABC, LPV/r, TDF	12	12	61	1	6	1	159	Resistenz
6	d4T, 3TC, NVP, APV, TDF	NVP, SQV, LPV/r	10	10	41	4	6	2	112	Resistenz
7	EFV, ddl, LPV/r, APV	3TC, TDF, IDV, LPV/r, APV	10	6	48	6	6	2	70	Patienten Entscheidung
8	3TC, APV, LPV/r	3TC, TDF, IDV, LPV/r	5	4	44	4	5	1	99	Nicht bekannt
9	d4T, RTV, IDV, SQV	3TC, TDF, APV, RTV	11	6	38	6	5	2	74	Leukoenzephalopathie
10	AZT, ABC, EFV	TDF, 3TC, LPV/r	>12	12	44	2	6	1	23	Toxizität
11	AZT, 3TC, ABC, TDF	3TC, LPV/r	8	5	39	3	6	1	95	Toxizität
12	ABC, 3TC, EFV	TDF, 3TC, ABC, LPV/r	17	11	41	2	6	1	76	Toxizität
13	3TC, d4T, EFV	TDF, 3TC, ABC, LPV/r	15	11	55	1	4	1	91	Resistenz
14	d4T, ABC, APV	3TC, ddl, TDF, EFV, LPV/r	14	10	61	4	6	1	82	Toxizität
Median			12	8	43.5	4	6	1	80.5	
Minimum			5	4	38	1	4	0	23	
Maximum			17	14	61	7	6	2	175	

Tabelle 2: Patienten Charakteristika von Patienten in Therapiepause (TP).

T₀: Therapie vor Therapiepause

T₂: Therapie nach Therapiepause

4.1.2.3 Virologische und immunologische Parameter

Bei 13 Patienten wurden die HIV Stämme als HIV-1 Subtyp B, bei Patient #3 als HIV-1 Subtyp C klassifiziert. In Abbildung 10 ist schematisch die zeitliche Einteilung der Proben dargestellt. Die VL, die einen Anhaltspunkt bezüglich der Wirksamkeit einer neuen Therapie gab und die CD4⁺-Zellzahl, die die immunologische Stabilität der Patienten zeigte, wurden während des gesamten Studienzeitraums erfasst (siehe Abb. 11 A und B). Die Patienten wurden aufgrund der gemessenen Viruslasten nach einem Jahr Therapie, nach Therapiepause, in zwei Gruppen eingeteilt:

1. „Responder“, die auf die neue Therapie ansprachen und bei denen in den Viruslastmessungen VL₃-VL₆ kein replizierendes Virus im Blut nachgewiesen werden konnte.
2. „Non-Responder“, bei denen ein Therapieversagen nachweisbar war. Als „Non-Responder“ wurden die Patienten klassifiziert, die an mindestens zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten eine messbare Viruslast hatten (Patienten #1,#3,#4,#6, #7,#8, #9 und #12).

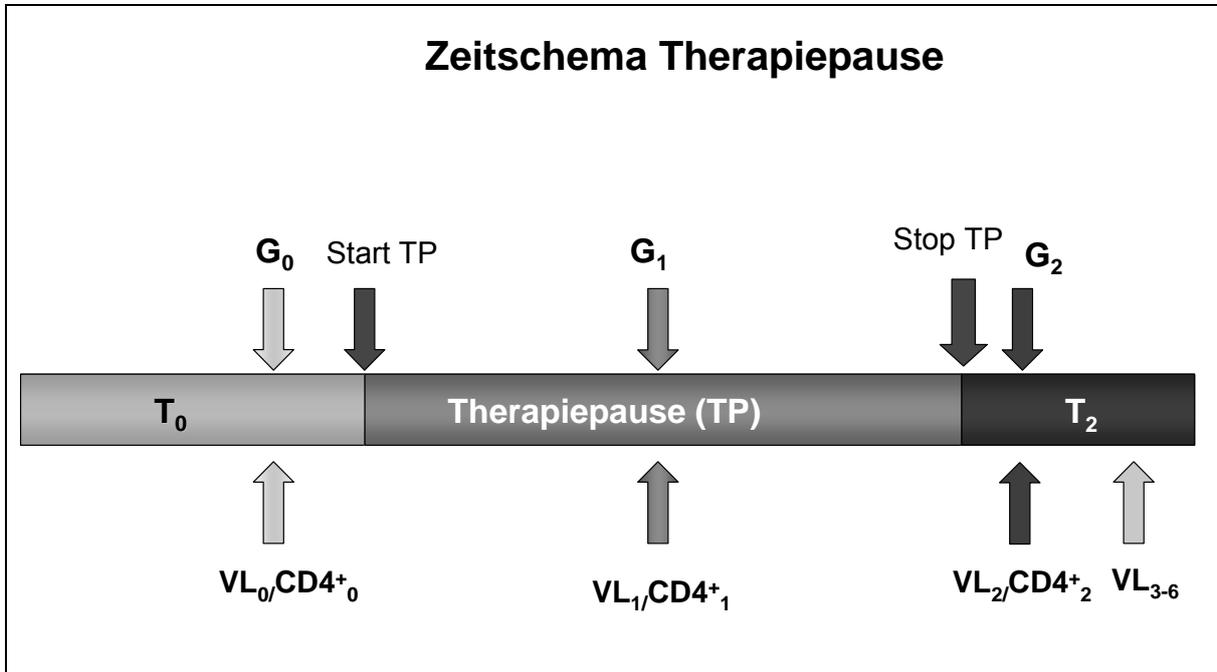


Abb. 10: Zeitschema der Probenentnahme

Genotypisierung (G), Viruslastmessung (VL) und CD4-Zellzahlbestimmung vor (Index 0), in (Index 1) und nach (Index 2) Therapiepause (TP). Die weiteren Proben zur Viruslastbestimmung wurden chronologisch nummeriert.

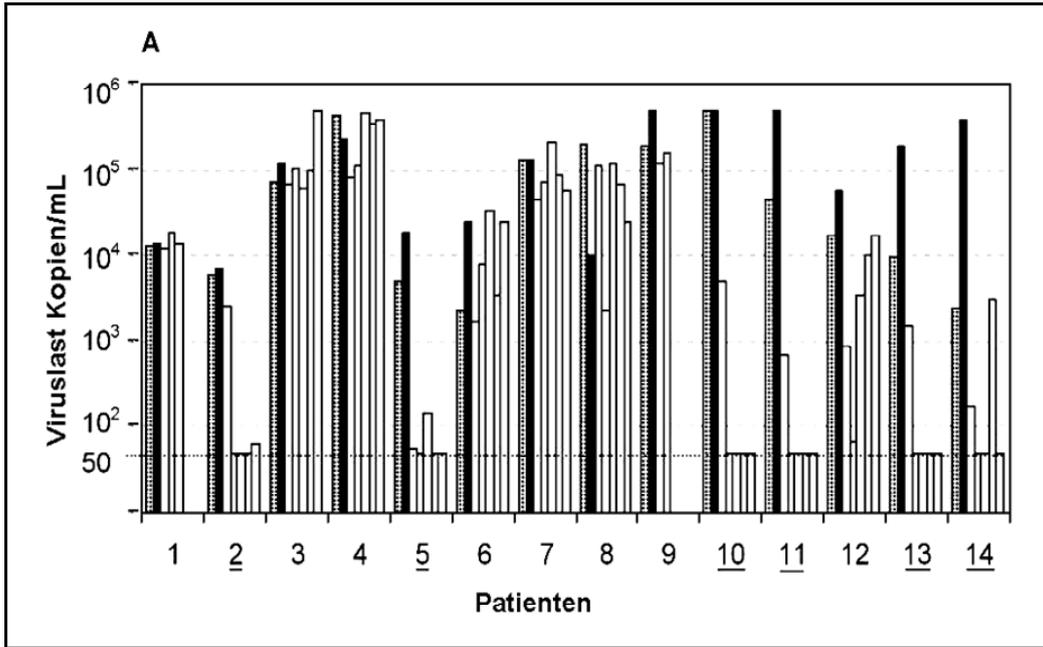


Abb. 11 A: Viruslast (VL) vor, während und nach Therapiepause (TP)

VL₀ (Säulen mit Schraffur): median 2.5 Tage in TP (von 54 vor TP - 23 in TP); VL₁ (schwarze Säulen): median 65 Tage in TP (von 21-159 Tage); VL₂ (Säulen in weiß): median 39 Tage unter neuem Therapieregime (26-188 Tage); VL₃ (weiße Säulen): median 17 Wochen unter der neuen Therapie (12-34 Wochen); VL₄ (weiße Säulen): median 36 Wochen unter neuer Therapie (von 23-45 Wochen); VL₅ (weiße Säulen): median 50 Wochen unter der neuen Therapie 34-70 Wochen); VL₆ (weiße Säulen): median 66 Wochen unter neuer Therapie (54-109 Wochen). Die „Responder“ (Ansprecher auf ART nach Pause) sind in der Grafik unterstrichen.

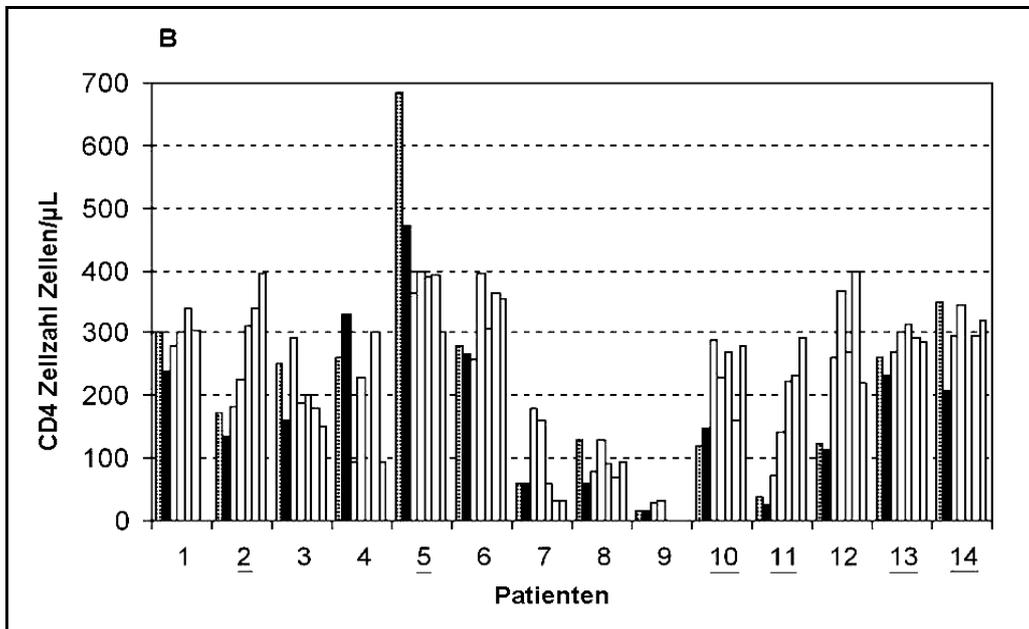


Abb. 11 B: CD4⁺-Zellzahl vor, während und nach Therapiepause (TP)

CD4⁺-Zellzahl-Verlauf (Zellen/µL). CD4₀ (Säulen schraffiert): median 2.5 Tage in TP (von 54 Tage vor TP - 23 in TP); CD4₁ (schwarze Säulen): median 65 Tage in TP (von 21-159); CD4₂ (weiße Säulen): median 39 Tage unter neuer Therapie (von 26-188 Tage); CD4₃ (weiße Säulen): median 17 Wochen unter neuer Therapie (von 12-34 Wochen); CD4₄ (weiße Säulen): median 36 Wochen unter neuer Therapie (von 23-45 Wochen); CD4₅ (weiße Säulen): median 50 Wochen unter neuem Therapieregime (zwischen 34-70 Wochen); CD4₆ (weiße Säulen): median 66 Wochen unter neuer Therapie (von 54-109 Wochen).

Die „Responder“ (Ansprecher auf ART nach Pause) sind in der Grafik unterstrichen.

Die Patienten starteten die Pause mit einer medianen Viruslast von 30820 Kopien/ml und einer CD4⁺-Zellzahl von 212 Zellen/μl.

Während der Therapiepause stieg die VL in der Gruppe der „Responder“ im median um 0,81 log₁₀ und bei der Gruppe der „Non-Responder“ um 0,11 log₁₀. Die CD4⁺-Zellzahl bei den „Respondern“ sank um 34 Zellen/μl und bei den „Non-Respondern“ um 11 Zellen/μl.

Nach medianen 16 Wochen erneuter Therapie nach Pause, sank die VL₃ auf mediane 1143 Kopien/ml und die CD4₃ stieg auf 230 Zellen/μl. Nach im Mittel 36 Wochen unter der neuen Therapie, lag VL₄ bei 3369 Kopien/ml. Alle „Responder“ hatten eine CD4⁺-Zellzahl von mehr als 300 Zellen/μl. Bei den „Non-Respondern“ gab es nach der Pause große Unterschiede bezüglich der CD4⁺-Zellzahl.

Generell konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ bezüglich Länge der Pause, VL und CD4-Spiegel vor, während und nach der Pause gefunden werden.

4.1.2.4 Resistenzprofil, Medikamentensensitivität und Effizienz der Therapieregime bewertet nach g2p und Stanford

Zur Detektion resistenzassoziierter Mutationen wurde eine Direktsequenzierung des *pol*-Gens jeweils vor, in und nach der Pause durchgeführt. Mit Hilfe von g2p und Stanford wurde die Wirksamkeit der Medikamente anhand der Sequenz überprüft (Abb. 12)

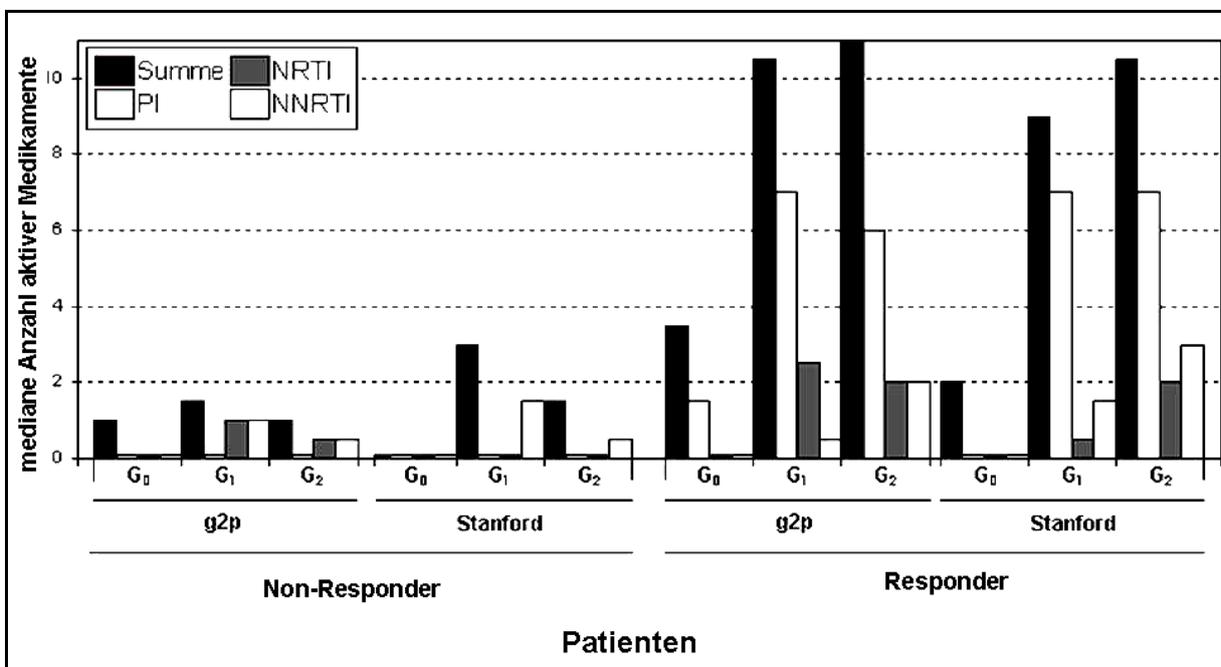


Abb. 12: wahrscheinliche Medikamentensensitivität des prädominanten Virusstamms gegenüber der antiretroviralen Therapie, vor, während und nach der Therapiepause

Nach Medikamentenstoffklassen getrennt, ist die mediane Anzahl der als voll-empfindlichen Substanzen, von Stanford und g2p ermittelten Medikamente dargestellt. Es wird unterschieden zwischen der Gruppe der 6 „Responder“ und der 8 „Non-Responder“. Diese Kalkulationen wurden zu den Zeitpunkten vor (G₀), in (G₁) und nach Therapiepause (G₂) und mit Hilfe der bioinformatischen Programme g2p und Stanford erstellt.

Vor der Pause zeigten die *pol*-Direktsequenzierungen von 12 der 14 Patienten mindestens eine primäre und eine sekundäre PI Mutation (median 7,5 PI Mutationen). Bei allen 14 Patienten waren mindestens drei NRTI Mutationen nachzuweisen (median 5,5 NRTI Mutationen) und die Viren von 10 Patienten zeigten NNRTI Mutationen (median 2 NNRTI Mutationen). Es konnte keine Korrelation zwischen der initialen Anzahl an NRTI und NNRTI Mutationen und dem Ansprechen auf eine neue Therapie nach der Pause gesehen werden. Bei den PIs konnte dagegen eine signifikante Korrelation ($p=0,028$) zwischen weniger oder gleich acht PI Mutationen und dem Ansprechen auf eine neue Therapie gefunden werden, obwohl drei Patienten (#1, #6, #2) mit weniger oder genau 8 PI-Mutationen nicht auf die nach der Pause folgende Therapie ansprachen. Bezüglich des Genotyps vor der Pause wurde der nach der Pause verabreichte PI bei allen 8 „Non-Respondern“ und auch bei vier der sechs „Responder“ als nicht voll wirksam bewertet. Bei den beiden anderen „Respondern“ wurde der nach der Pause gegebene PI LPV/r aufgrund des Resistenzprofils vor der Pause als wirksam beurteilt.

Während der Therapiepause wurde im median nach 67 Tagen (von 34-159) eine Genotypisierung durchgeführt. Bei drei Patienten waren in der Pause keine resistenzassoziierten Mutationen nachweisbar, eine Reduktion von resistenzassoziierten Mutationen konnte bei weiteren sieben Patienten nachgewiesen werden und keine Veränderungen des Resistenzprofils waren bei vier Patienten zu sehen. Nach „Respondern“ und „Non-Respondern“ getrennt betrachtet sieht man einen Rückgang von primären und sekundären PI Mutationen bei den Respondern um 87,5% und bei den Non-Respondern um 36,7% (gesamt 49,2%). Bezogen auf die NNRTIs lag die Rückgangsfrequenz bei den „Respondern“ bei 42,9% vs. 40% bei den „Non-Respondern“ (gesamt 42,9%). Während der Therapieunterbrechung konnten bei zwei Patienten neue Mutationen detektiert werden, nämlich RT K70R (#12) und RT-G190A (#1). In der Pause war die Anzahl an PI Mutationen ein prädiktiver Parameter für den Erfolg der Therapie nach der Pause. Eine signifikante Korrelation von weniger oder gleich einer sekundären PI Mutation ($p=0,0093$) oder keiner primären PI Mutation ($p=0,028$) und dem Erfolg der Therapie (T_2) nach der Pause konnte ermittelt werden. Zusätzlich korrelierte auch der komplette Rückgang von primären PI Mutationen mit der Dauer von 48 Tagen Pause ($p=0,045$). Beide Interpretationssysteme ermittelten anhand des Genotyps einen Anstieg der Anzahl voll aktiver Substanzen in der Pause. Es bestand eine signifikante Korrelation ($p=0,027$) von dem Anstieg um einen oder mehr aktive PIs in der Pause und einer wirksamen Therapie nach der Pause. Zwischen dem Rückgang von NRTI oder NNRTI Mutationen in der Pause oder bezüglich der NRTI oder NNRTI sensitiven Viren und dem Erfolg einer neuen Therapie nach der Pause konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

Im Median 39 Tagen nach der Therapiepause wurde unter der neuen Therapie eine Genotypisierung durchgeführt. Bei neun Patienten wurden weniger Mutationen als vor der Pause gefunden, bei vier Patienten wurde das gleiche Resistenzprofil wie vor der Pause detektiert und das Virus von Patient #1 akkumulierte sogar Mutationen. Verglichen mit dem Genotyp vor der Therapiepause wurden im gesamten Patientenkollektiv die PI Mutationen um 29%, die NRTI Mutationen um 36% und die NNRTI Mutationen um 41% reduziert. Bei den „Respondern“ gingen 88% der PI Mutationen, 53% der NRTI Mutationen und 86% der NNRTI Mutationen verloren. Dagegen sah man bei der Gruppe der „Non-Responder“ nur einen Rückgang von 10% der PI Mutationen, 19% der NRTI und 27% der NNRTI Mutationen. Die Mutationen RT-K219Q, RT-D67G (Pat. #1), RT-V108I (Pat. #6) und PR-K20R und RT-K219Q (Pat. #12) wurden nach der Pause neu unter entsprechenden Therapieregimen detektiert.

In Tabelle 3 sind die Mutationen vor, in und nach Therapiepause nach Stoffklassen getrennt aufgeführt.

In Abbildung 13 ist eine Übersichtsgrafik der 14 Patienten mit der Dynamik des Resistenzmusters im Laufe der Therapiepause und unter einer neuen Therapie dargestellt.

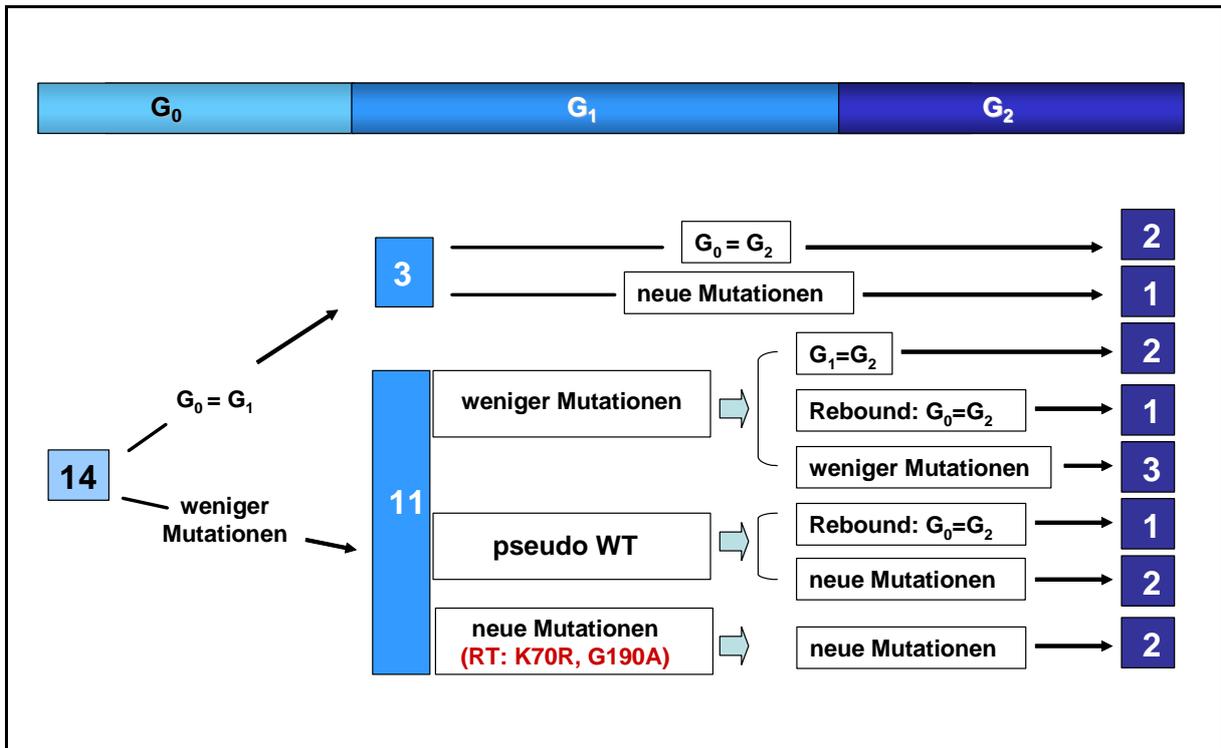


Abb. 13 : Übersichtsgrafik der Mutationsdynamik der 14 Patienten vor, in und nach der Therapiepause

G₀: Genotypisierung vor Pause

G₁: Genotypisierung in Pause

G₂: Genotypisierung nach Pause

Die Medikamentenwirksamkeits-Bewertung durch geno2pheno und Stanford unter der neuen Therapie waren ähnlich wie die Bewertungsergebnisse in der Therapiepause. Um herauszufinden, ob es eine Korrelation zwischen Medikamentensensitivität bezüglich des Genotyps nach der Pause und dem Erfolg der Therapie nach der Pause gibt, wurde die Anzahl von in der Therapie enthaltenen wirksamen Substanzen ermittelt (Tabelle 4).

Ergebnisse

#	g2p						Stanford					
	Wirksame Medikamente in T ₀ vorhergesagt mit G ₀			Wirksame Medikamente in T ₂ vorhergesagt mit G ₂			Wirksame Medikamente in T ₀ vorhergesagt mit G ₀			Wirksame Medikamente in T ₂ vorhergesagt mit G ₂		
	PI	NRTI	NNRTI	PI	NRTI	NNRTI	PI	NRTI	NNRTI	PI	NRTI	NNRTI
1	-	-	NVP	-	3TC	-	-	-	NVP	-	3TC	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	ddl	-	-	3TC	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	NVP	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	3TC+ABC	-	-	-	-	LPV/r	3TC	-
2	-	-	-	LPV/r	3TC+TDF	-	-	-	-	APV/r+ LPV/r	3TC+TDF	-
5	-	-	-	LPV/r	d4T*	-	-	-	-	LPV/r	d4T*+3TC+TDF	-
10	-	-	-	LPV/r	3TC	-	-	-	-	LPV/r	-	-
11	-	-	-	LPV/r	3TC	-	-	-	-	LPV/r	-	-
13	-	-	-	LPV/r	3TC	-	-	-	-	LPV/r	3TC	-
14	-	-	-	LPV/r	3TC+ddl	EFV	-	-	-	LPV	3TC+TDF+ABC	EFV

Tabelle 4: Wirksame Medikamente des Therapieregims (T₀ oder T₂) die anhand des Genotyps (G₀ oder G₂) als aktive Substanzen durch g2p und Stanford bewertet wurden.

Die grau unterlegten Felder markieren die Patienten mit einem Therapieerfolg. *d4T wurde nach 195 Tagen aus dem Therapieregime genommen. Der Patient nahm dann LPV/r, ABC und TDF ein, aber nur LPV/r wirkte als voll aktive Substanz. APV: Amprenavir; LPV/r: geboosted Lopinavir; ddl: Didanosine; d4T: Stavudine; 3TC: lamivudine; ABC: Abacavir; TDF: Tenofovir; NVP: Nevirapin.

Wir definierten Substanzen als wirksam, wenn sie von den Algorithmen als voll aktiv bewertet wurden und Bestandteil der aktuellen Therapie waren. Vor der Pause war die Anzahl wirksamer Substanzen median 0 (von 0-1 (g2P und Stanford)). Unter der neuen Therapie nach der Pause war bei den „Non-Respondern“ nach g2p median 0,5 nach Stanford median 0 (beide von 0-2) wirksame Medikamente zu sehen. Zum Vergleich wurden bei den „Respondern“ median 2 (von 2-4 nach g2p) bzw. 3 (von 1-4 nach Stanford) als wirksame Medikamente bewertet. Es bestand eine signifikante Korrelation von einem oder mehr als einem wirksam interpretierten PI und dem erfolgreichen Ansprechen auf T₂ (p=0,0003 nach g2p und p=0,0023 nach Stanford). Diese Vorhersage traf auf alle 6 „Responder“ zu, versagte aber bei zwei „Non-Respondern“. Bei den Patienten #8 und #12 wurde anhand des Genotyps in der Pause erwartet, dass LPV/r in der neuen Therapie wirksam sein sollte. Bei beiden Patienten tauchten jedoch nach der Pause Stämme mit Mutationen auf, die in der Pause nicht sichtbar waren. In diesem Kollektiv konnte keine Korrelation zwischen wirksamen NRTIs und NNRTIs und dem Therapieerfolg festgestellt werden.

4.1.3 Evolution von Virusstämmen stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten vor und in einer Therapiepause (Patientenkollektiv 2)

Das zweite Therapiepausokollektiv besteht ebenfalls aus chronisch infizierten HIV-Patienten, die schon über einen langen Zeitraum mit antiretroviralen Medikamenten behandelt wurden und deren Virusstämme eine hohe Kreuzresistenz und damit nur noch geringe Sensitivität gegenüber Medikamenten zeigten. Auch hier sollten die Änderungen des Resistenzprofils aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks durch das Aussetzen der Therapie nachvollzogen werden. Dafür wurden 57 multipel vorbehandelte Patienten in einer retrospektiven Analyse untersucht. Die Evolution der Resistenzprofile der Viruspopulationen dieser Patienten wurde im Gegensatz zum ersten Kollektiv nur vor und während der Therapiepause beobachtet. Zusätzlich wurde der Einfluss anderer klinischer und virologischer Parameter auf die Evolution der Resistenzen überprüft. Die Genotypen, die Vortherapien, die Viruslast und die CD4⁺-Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeiten wurden ermittelt. Daten vor der Therapiepause bekamen einen Index mit der Zahl 0, alle Daten aus der Therapiepause einen Index 1. Mehrere Genotypen in der Therapiepause wurden mit einem weiteren Subindex 1A, 1B, 1C usw. gekennzeichnet.

4.1.3.1 Klinische Daten der Patienten vor und in Therapiepause

Acht der 57 Patienten waren weiblich, 49 Patienten männlich. Die mediane Dauer der Pause bei der ersten Analyse in der Pause betrug median 58 Tage (von 26 bis 569 Tage). Die Patienten waren im Median mit Medikamenten aus drei Stoffklassen (1-4 Stoffklassen), mindestens aus zwei Stoffklassen vorbehandelt. Eine dritte Stoffklasse wurde bei einigen Patienten nicht eingesetzt, da aus medizinischen Gründen die Gabe nicht möglich war. Im Median waren in den Vortherapien zwei PIs (von 0- 6), fünf NRTIs (von 2-7) und ein NNRTI (von 0-2) angewandt worden. Ein Patient bekam vor der Therapiepause den Fusionsinhibitor T20. Bei 53 der 57 Patienten hatten im median bereits sechs Therapien (von 1 bis 22) versagt. Bei den übrigen vier Patienten gab es keine Angaben über die eingenommenen Therapieregime. 54 Patienten nahmen im median vor der Pause seit sechs Jahren (von 1 bis 14 Jahre) Medikamente ein, bei drei Patienten lagen keine Informationen zum Beginn der antiretroviralen Therapie vor. Die unterschiedlichen Gründe, die zum Abbruch der Therapie führten waren virologische Resistenz, Toxizität, oder die persönliche Entscheidung der Patienten.

4.1.3.2 Virologische und immunologische Parameter

Bei 52 Patienten wurden die HIV Stämme als HIV-1 Subtyp B, bei drei Patienten als HIV-1 Subtyp A und bei zwei Patienten als Subtyp C klassifiziert. Die VL und die CD4⁺-Zellzahl wurden vor und in der Pause gemessen. Die Patienten starteten die Pause mit einer medianen Viruslast von 5728 Kopien/ml (212-500000 Kopien/ml, 49 von 57 Patienten

auswertbar) und einer CD4⁺-Zellzahl von 391 Zellen/ μ l (4-1060 Zellen/ μ l, 48 von 57 auswertbar). Während der Therapiepause stieg die VL auf mediane 41037 Kopien/ml (2472-500000 Kopien/ μ l, 50/57 auswertbar) an. Die CD4⁺-Zellzahl sank median um 115 Zellen/ μ l auf 236 Zellen/ μ l (2-929 μ l). Bei 15 Patienten konnte aufgrund fehlender Messungen keine Tendenz bezüglich der Viruslastentwicklung in der Pause ermittelt werden, bei 37 Patienten war ein deutlicher Anstieg der Viruslast zu sehen, bei drei Patienten blieb die Viruslast stabil und bei zwei Patienten war ein geringer Abfall der Replikationsaktivität zu messen. Die CD4⁺-Zellzahl fiel bei 35 Patienten der 45 auswertbaren Patienten, blieb bei fünf Patienten gleich und stieg bei fünf Patienten an.

Die Gruppe der Patienten von denen es Viruslast- und CD4⁺-Zellzahldaten vor und in der Pause gab (n=40) wurden aufgrund ihrer Viruslast vor der Pause in zwei gleich große Gruppen geteilt. Die erste Gruppe wurde von Patienten gebildet, die eine geringere Viruslast als 5500 Kopien/ml aufwiesen, die Patienten aus Gruppe zwei hatten eine höhere VL als 5500 Kopien/ml. Es gab keine Korrelation zwischen einer geringeren Viruslast vor der Therapiepause und einem stärkeren Viruslastanstieg, d.h. mehr als 10.000 Kopien Anstieg ($p=0,5$). Es konnte jedoch eine Korrelation ($p=0,02$) zwischen einer geringeren Viruslast vor der Pause und einem stärkeren CD4⁺-Zellzahlabfall in der Pause (Abfall mehr als 150 Zellen/ μ l) festgestellt werden.

Ebenfalls wurde eine Einteilung in zwei Gruppen anhand der CD4⁺-Zellzahl vor der Pause (CD4₀) vorgenommen. Bei 19 Patienten mit einer geringen CD4⁺-Zellzahl wurden weniger, bei 21 Patienten in mehr als 350 CD4-Zellen/ μ l nachgewiesen. Es konnte keine Korrelation zwischen dem CD4⁺-Zellzahlabfall in der Pause und der Ausgangs CD4₀-Zellzahl gefunden werden. Dagegen wurde eine stark signifikante Korrelation zwischen einem Viruslastanstieg um mehr als 50.000 Kopien/ml und einer geringeren CD4⁺-Ausgangszellzahl (CD4₀) gezeigt ($p=0,01$). In einer letzten Analyse wurde die Gesamtgruppe der 40 Patienten von denen Daten zur Pausenlänge, VL und CD4⁺-Zellzahl vorlagen bezüglich der Pausenlänge in zwei Gruppen unterteilt. Patienten mit einer längeren vs. kürzeren Pause als 50 Tage. Zwischen der Dauer der Pause und einem entsprechenden stärkeren Anstieg der Viruslast oder Abfall der CD4⁺-Zellzahl konnte keine Korrelationen in der Pause gefunden werden.

4.1.3.3 Resistenzprofil und Rückgang von resistenzassoziierten Mutationen in der Therapiepause

Durch eine Direktsequenzierung des *pol*-Gens vor und in der Pause wurden resistenzassoziierte Mutationen detektiert. In der Abbildung 14 A, B, C und D ist die Prävalenz einzelner Mutationen getrennt nach Stoffklassen vor und in Therapiepause dargestellt. Vor der Therapiepause wurden bei allen 57 Patienten insgesamt 438 resistenzassoziierte Mutationen nachgewiesen. Davon waren 223 NRTI, 153 PI und 62

NNRTI assoziierte Mutationen. Vor der Pause zeigten die *pol*-Direktsequenzierungen von 31 der 57 Patienten mindestens eine primäre und eine sekundäre PI Mutation (median 2 PI Mutationen, Minimum 0 Mutationen, Maximum 12 Mutationen) (Abb. 14 A, B), bei 54 Patienten war mindestens 1 NRTI Mutation nachzuweisen (median 3 NRTI Mutationen) und zusätzlich wurde bei einem Patient eine Revertante an der Aminosäureposition 215 der Reversen Transkriptase nachgewiesen (Abb. 14 C). Diese Revertante ist nicht assoziiert mit einer phänotypischen Resistenz, ist aber ein Indikator einer vorherigen Resistenz. Die Viren von 35 Patienten zeigten NNRTI Mutationen (median 1 NNRTI Mutation 0-3) (Abb. 14 D). Bei drei Patienten konnten keine resistenzassoziierten Mutationen vor Beginn der Therapiepause gefunden werden.

Während der Therapiepause wurde im median nach 58 Tagen (von 26-569) eine Genotypisierung durchgeführt. Insgesamt sank die Anzahl an Resistenzen von 438 auf 244 (44%) Mutationen. Die Anzahl von 223 NRTI Mutationen vor der Pause sank insgesamt um 49,3% auf 113 NRTI Mutationen. Bei vier Patienten mit vorheriger Resistenz an Position 215 konnte in der Pause eine Revertante an Position 215 detektiert werden. Anstelle der T215Y traten in der Pause gehäuft Revertanten an dieser Position auf, was sich durch den Austausch einer einzelnen Base erklären lässt, der zwar zu einem phänotypischen, nicht aber zum eigentlichen genetischen Wildtyp führt. Die höchste Prävalenz, mit jeweils 32 Mutationen vor Pause, wurde an den Positionen 215F/Y und M184V nachgewiesen. Auffällig ist der Rückgang der M184V bei allen Patienten, die diese vor der Pause aufwiesen. Wie in Abbildung 14 C aufgeführt, traten in dem Kollektiv am häufigsten TAM-assoziierte Mutationen auf. Betrachtet man den Rückgang dieser Mutationen in der Therapiepause (Tab.5), lässt sich eine Reihenfolge bezüglich ihres Rückgangs aufstellen. Die höchste Rückgangrate hat die D67N (57%), gefolgt von L210W und T215Y/F (54 bzw. 53%). Die K219E/Q folgte mit 45% und die M41L ging um 39% in der Pause zurück. Die geringste Rate bezüglich eines Rückgangs in der Pause war bei der K70R zu sehen.

Dahingegen bleibt die Anzahl der MDR-Mutationen an den Positionen F77L und F116Y, die mit einem multi-NRTI Versagen gekoppelt ist, relativ konstant.

Ergebnisse

NRTI Mutationen	Mutationen VTP	Mutationen ITP	Rückgang
M184V	32	0	100%
Y115F	5	2	60%
D67N	21	9	57%
Q151M	7	3	57%
L210W	13	6	54%
T215Y/F	32	15	53%
T69D	6	3	50%
K219E/Q	20	11	45%
V75I/T/M	9	5	45%
M41L	23	14	39%
L74V/I	7	5	28%
K70R	23	17	26%
A62V	4	3	25%
F77L	5	5	0%
F116Y	5	5	0%
K65R	3	3	0%

Tabelle 5: Prävalenz NRTI assoziierter Mutationen vor und in Therapiepause

Grün markiert sind Thymidin Analoga assoziierte Mutationen, in hellblau sind „*multi-drug resistance*“ (MDR) Mutationen, die mit einem multiplen NRTI Versagen gekoppelt sind unterlegt. VTP: vor Therapiepause, ITP: in Therapiepause

Die Anzahl der nachgewiesenen PI Mutationen sank von 153 auf 86 Mutationen um 56,2%. Hier konnte insgesamt nur ein geringer Unterschied zwischen dem Absinken der primären PI assoziierten Resistenz (57%) und den sekundären resistenzassoziierten Mutationen (55%) festgestellt werden. Ein starker Rückgang (>50%) war bei den primären PI Mutationen an den Positionen G48V, V82F/T/S/L und L90M zu verzeichnen (Tab. 6). Bei den sekundären PI Mutationen wurde ein starker Rückgang an den Positionen G73S/A (Rückgang um 88%) und L24I (Rückgang um 67%) nachgewiesen (Tab. 7).

Prim. PI Mutationen	Mutationen VTP	Mutationen ITP	Rückgang
G48V	2	0	100%
V82F/T/S/L	8	0	100%
L90M	22	10	55%
D30N	2	1	50%
V32I	2	1	50%
V33F	4	2	50%
I47VA	2	1	50%
N88S/D	2	1	50%
I84V	9	5	45%
V82A	7	4	43%
M46I/L	9	3	33%
I54	15	12	20%

Tabelle 6: Prävalenz primärer Protease Inhibitor Mutationen vor und in Therapiepause
VTP: vor Therapiepause, ITP: in Therapiepause

Ergebnisse

Sek. PI Mutationen	Mutationen VTP	Mutationen ITP	Rückgang
G73S/A	9	2	88%
L24I	3	1	67%
F53L	2	1	50%
T74P	2	1	50%
A71V/T	21	11	48%
L10I/V/F	30	18	40%
Q58E	3	2	33%
V11I	1	1	0%
L23I	0	0	0%
L43T	2	2	0%
N83D	1	1	0%
L89V	2	2	0%

Tabelle 7: Prävalenz sekundärer Protease Inhibitor Mutationen vor und in Therapiepause
VTP: vor Therapiepause, ITP: in Therapiepause

NNRTI assoziierten Mutationen zeigten auch einen Rückgang in der Pause. Die Anzahl dieser Mutationen sank von 62 auf 45 um 27%. Bei keiner NNRTI Mutation ging die Prävalenz im Kollektiv in der Pause um mehr als 50% zurück (Tab. 8). Bei 15 der 35 Patienten mit NNRTI assoziierten Mutationen vor der Pause wurden weniger Mutationen in der Pause detektiert. Bei 15 Patienten mit NNRTI Mutationen vor der Pause blieb die Anzahl in der Pause konstant und bei den übrigen fünf Patienten, stieg die Anzahl dieser Mutationen in der Pause an.

NNRTI Mutationen	Mutationen VTP	Mutationen ITP	Rückgang
K101E/P	2	1	50%
G190A	12	7	42%
Y181C	10	6	40%
L100I	5	3	40%
Y188L	3	2	33%
K103N/S	18	13	28%
V108I	4	3	25%
A98G	3	3	0%
V179D/E/F	3	3	0%
V106A/M	2	2	0%
E138K	0	0	0%

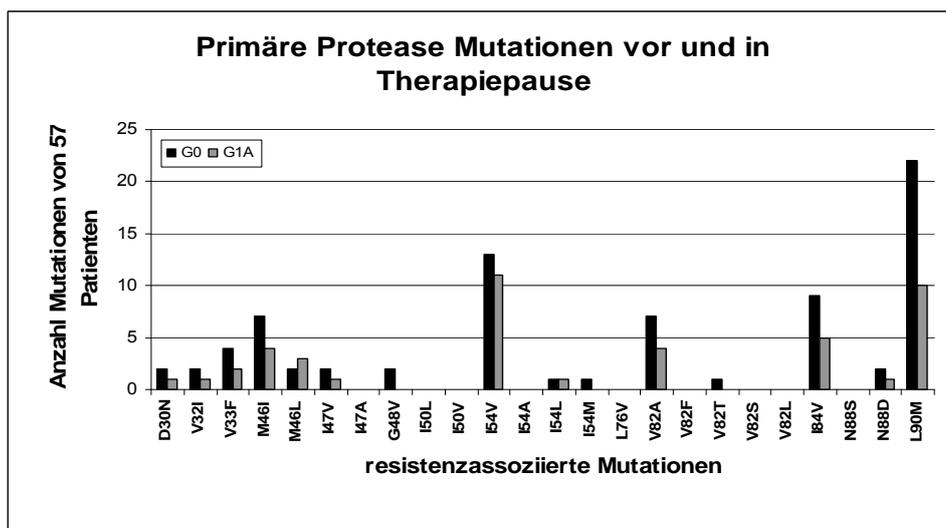
Tabelle 8: Prävalenz von NNRTI assoziierten Mutationen vor und in Therapiepause
VTP: vor Therapiepause, ITP: in Therapiepause

Bei 14 Patienten konnten in der Pause keine resistenzassoziierten Mutationen mehr nachgewiesen werden, eine Wildtypvariante lag vor. Eine Reduktion von resistenzassoziierten Mutationen wurde bei weiteren 29 Patienten gefunden, keine Veränderungen des Resistenzprofils waren bei neun Patienten zu sehen. Bei acht Patienten wurden im Genotyp G_{1A} (in Therapiepause) Mutationen detektiert, die im Genotyp G₀ (vor Therapiepause) noch nicht zu finden waren. 13 der 57 Patienten besaßen noch mindestens

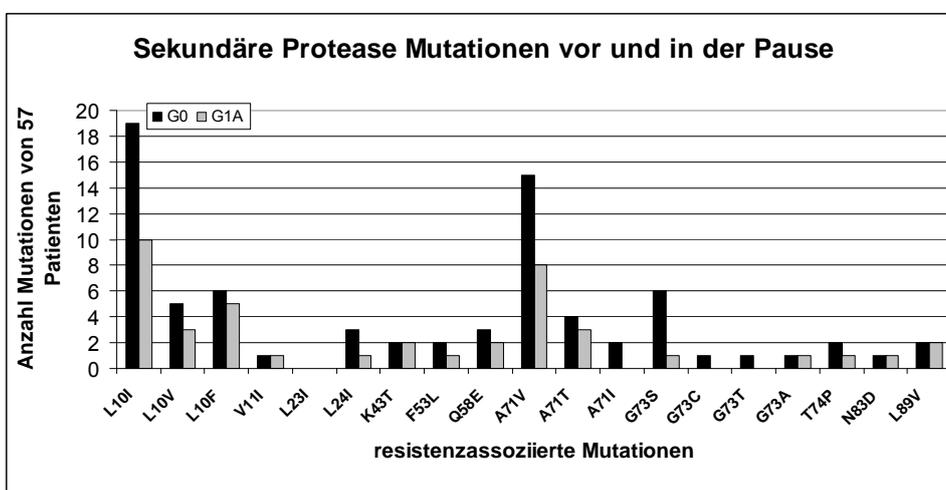
Ergebnisse

eine primäre und eine sekundäre PI Mutation (median 0 PI Mutationen Minimum 0 Mutationen, Maximum 12 Mutationen), bei 35 Patienten war mindestens 1 NRTI Mutation nachzuweisen (median 1 NRTI Mutationen) und die Viren von 24 Patienten zeigten NNRTI Mutationen (median 0 NNRTI Mutationen 0-5). Zwischen der initialen Anzahl an Mutationen und dem Auftreten eines Wildtypvirus in der Pause konnte keine Korrelation ermittelt werden ($p=0,47$ für mehr als sechs Mutationen und Auftreten eines Wildtyp in Pause). Eine stark signifikante Korrelation ($p=0,001$) wurde für die Dauer der Pause ≥ 51 Tage und die Detektion eines Wildtypvirus in der Pause und ebenfalls für die Dauer der Pause ≥ 51 Tage und den Rückgang um mehr als zwei resistenzassoziierte Mutationen gefunden. Bei zehn der 14 Patienten, die in der Therapiepause ein Wildtypvirus entwickelten, lagen Daten zu CD4-Zellzahl und Viruslast vor. Zwischen der CD4-Zellzahl und der Viruslast vor und in Pause und dem Auftreten eines Wildtypvirus konnte kein Zusammenhang hergestellt werden. Eine signifikante Korrelation von einem Rückgang der CD4-Zellzahl um mehr als 40% und dem Auftreten eines Wildtypvirus konnte festgestellt werden ($p=0,048$). Dagegen ergaben der Viruslastanstieg und das prinzipielle Auftreten eines Wildtypvirus keine Korrelation.

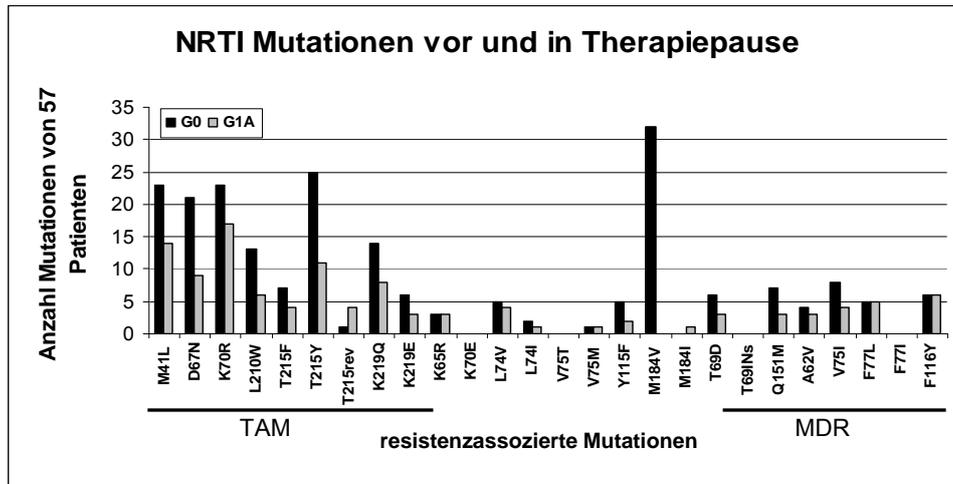
A)



B)



C)



TAM: Thymidinanaloga-Mutationen, MDR: "multi drug resistance" Mutationen

D)

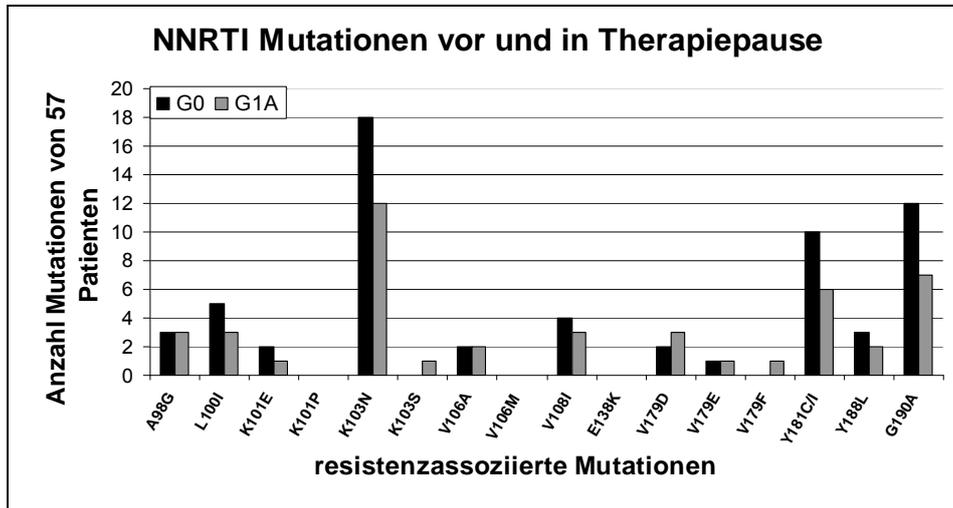


Abb. 14: Resistenzassoziierte Mutationen vor (G₀) und in (G_{1A}) der Therapiepause unterteilt nach Stoffklassen

- A) Anzahl primärer Protease assoziierte Mutationen
- B) Anzahl sekundärer Protease assoziierte Mutationen
- C) Anzahl NRTI assoziierter Mutationen, TAM Mutationen zeigen die Mutationen die mit einer Resistenz gegenüber Thymidinanaloga assoziiert sind, MDR-Mutationen zeigen die Positionen die mit einer multi-Resistenz gegenüber allen NRTIs assoziiert sind.
- D) Anzahl NNRTI assoziierter Mutationen

Bei 30 der 57 Patienten wurde ein zweiter Genotyp (G_{1B}) im Median nach 122 Tagen (min. 54, max. 1017 Tage Pause) in Therapiepause erfasst und ausgewertet. Die Anzahl an resistenzassoziierten Mutationen sank von 411 (vor Pause) bzw. 229 (erster Genotyp in Pause) auf 98. Dies bedeutet im Vergleich zu G₀ um 76,2% und im Vergleich zu G_{1A} um 57,2%. Bei sieben der 30 Patienten konnten in G_{1B} keine resistenzassoziierten Mutationen mehr nachgewiesen werden. Eine Reduktion von resistenzassoziierten Mutationen wurde bei weiteren zwölf Patienten gefunden und keine Veränderungen des Resistenzprofils zu G_{1A} waren bei sieben Patienten zu sehen. Bei vier Patienten wurden im Genotyp G_{1B} Mutationen

detektiert, die im Genotyp G_{1A} nicht zu finden waren, aber schon vor Therapiepause in G₀ detektiert wurden. Bei allen vier Patienten trat aber nicht der gleiche Genotyp wie vor der Pause auf, sondern im Vergleich dazu waren Mutationen verloren gegangen. Sieben der 30 Patienten besaßen noch mindestens eine primäre und eine sekundäre PI Mutation (median 0 PI Mutationen, min. 0, max. 9 Mutationen), bei 16 Patienten war mindestens 1 NRTI Mutation nachzuweisen (median 1 NRTI Mutationen min. 0, max. 9) und die Viren von acht Patienten zeigten NNRTI Mutationen (median 0 NNRTI Mutationen min. 0, max. 2).

4.1.3.4 Analyse der RT Aminosäurepositionen 103 und 219 auf Codonebene

Wie bereits oben für die AS Position 215 beschrieben, hinterlassen Resistenzen „Fingerabdrücke“ im Genom. Beim Rückgang der Mutation T215Y/F treten oftmals Varianten auf, die immer noch eine veränderte Aminosäure aufweisen, phänotypisch aber zu keiner Resistenz führen. Solche Mutationen weisen auf eine ehemalige Resistenz an dieser Position hin. Die Mutationen T215 D, S, N sind ein solcher Hinweis. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob auch stille Mutationen an bestimmten Aminosäurepositionen mit vormaliger Resistenz assoziiert sind. Für zwei resistenzassoziierten Mutationen wurde analysiert, ob bei Patienten, die in der Pause an diesen Positionen einen Wildtyp entwickelten, noch stille Mutationen nachweisbar sind und eine Unterscheidung auf Codonebene zu unbehandelten Patienten möglich ist. Wenn Codonabweichungen gefunden werden, könnten diese ebenfalls als Marker für ehemals resistente Viren dienen.

Die Mutation K103N wurde ausgewählt, da eine relativ hohe Prävalenz im Kollektiv vorlag und in der Pause ein deutlicher Rückgang der Mutation zu beobachten war. Bei 18 Patienten wurde vor der Pause eine K103N detektiert. Bei allen 18 Patienten wurde das Resistenz vermittelnde Asparagin (N) durch das Triplett AAC kodiert. Bei elf Patienten war in der Pause kein Rückgang dieser Resistenz zu verzeichnen. Bei den übrigen sieben Patienten wurde die Wildtyp-Aminosäure Lysin (K) detektiert. Diese wurde bei 5 Patienten durch ein AAA codiert, wohingegen zwei Patienten ein G als stille Mutation an dritter Position des Codons (AAG) zeigten. Als Vergleichsgruppe wurde bei 20 therapienaiven Patienten, die keine übertragenen Resistenzen aufwiesen, ebenfalls der Codongebrauch überprüft. Hier wurde bei 18 Patienten ein AAA gefunden und bei zwei Patienten ein AAG. Dies deutet darauf hin, dass ein Auftreten einer stillen Mutation nicht unbedingt auf eine vorherige Resistenz schließen lässt.

An der K219Q/E wurde ebenfalls untersucht, ob anhand des Codongebrauchs eine Aussage über ehemals resistente Virusstämme zu treffen ist. Diese Position wurde ausgewählt, da sie ebenfalls wie die T215Y/F eine Thymidinanalog-assoziierte Mutation ist und relativ spät in der Resistenzentwicklung gegen AZT auftritt. Auch hier wurden die Patienten untersucht, bei denen sich in der Therapiepause ein Wildtyp für diese Mutation entwickelte. Vor der Pause

war die K219Q oder K219E bei 20 Patienten zu detektieren. In der Pause wurde sie noch bei elf Patienten nachgewiesen. Bei den übrigen neun Patienten wurde die neu detektierte Wildtyp-Aminosäure in der Pause durch ein AAA Codon kodiert und auch die Vergleichsgruppe der 20 therapienaiven Patienten zeigte an dieser Position die Wildtypsequenz AAA. Somit konnten zwischen dem Auftreten stiller Mutationen und einer vorherigen Resistenz keine Korrelationen gefunden werden.

4.1.3.5 Detektion von „neuen“ Mutationen in der Therapiepause

a) Nachweis „neuer“ PI Mutationen

Auch PI assoziierte Mutationen traten in oder kurz nach der Pause auf. In Kollektiv 1 wurde bei Patient #12 in T₂ eine PI Mutation an Position K20R detektiert. Obwohl diese Mutation nicht in den Genotypen vor und in der Pause zu finden waren zeigte eine Rückstellprobe, die ein Jahr vor der Therapiepause sequenziert wurde, bereits diese Mutation. Der Vergleich des Resistenzprofils der alten Probe mit dem Genotyp nach der Pause ergab aber Abweichungen. Die K20R deutet daher auf eine erneute Mutation an dieser Stelle oder auf eine Selektion einer alten Virusvariante mit dieser Mutation hin. In Kollektiv 2 wurden keine neuen Mutationen während der Pause im Bereich der Protease detektiert.

b) Nachweis „neuer“ NNRTI Mutationen

Wie bereits unter 4.1.3.3 erwähnt, wurden sechs „neue“ NNRTI assoziierte Mutationen in der Therapiepause detektiert, die vor der Pause noch nicht nachweisbar waren. Neue NNRTI assoziierte Mutationen wurden an den RT Aminosäurepositionen 103 (Patient #27, Patient #43), 108 (1 Patient #6 erstes Kollektiv), 179 (Patient #27, Patient #23) und 190 (Patient #9) in der Pause beobachtet.

Von den Patienten #27, #43 wurden je ein Genotyp vor und einer in der Therapiepause analysiert. Beide Patient wurde mit einer Dreifachkombination AZT, 3TC und EFV behandelt. Obwohl vor der Pause keine NNRTI Mutationen nachweisbar waren, konnte in der Pause bei Patient #23 sowohl eine K103N als auch eine V179D detektiert werden. Bei Patient #43 wurde eine K103N in der Pause neu nachgewiesen.

Auch Patient #23 wurde mit AZT, 3TC und EFV behandelt. Vor der Pause war auch hier keine NNRTI assoziierte Mutation zu sehen. In der Pause wurde eine V179F detektiert.

Patient #6 zeigte in G₂, obwohl er mit einem PI Regime behandelt wurde, eine V108I. Die Therapie vor der Pause enthielt einen NNRTI.

Patient #9 wurde vor der Pause mit AZT, 3TC und NVP behandelt und erst in der Pause wurde eine G190A detektiert.

c) Nachweis „neuer“ NRTI Mutationen

Bei drei Patienten tauchte in einer Therapiepause die Mutation K70R auf. Da die K70R eine von mehreren Mutationen ist, die mit einer Thymidinanaloga-resistenz assoziiert ist, wurden die drei Patienten bezüglich dieser Mutationen genauer analysiert.

Bei Patient 7 lagen zwei Genotypen vor. Vor der Pause wurden die Mutationen M41L, D67N, L210W und T215Y detektiert, von denen die M41L, D67N und die L210W in der Pause verschwanden. Die Mutation T215Y blieb in der Pause erhalten. Zusätzlich wurde die K70R in der Therapiepause gefunden (Tab. 9 A)

Tymidinanaloga assoziierte Mutationen bei Pat. #7	G ₀	G ₁
M41L	+	-
D67N	+	-
K70R	-	+
L210W	+	-
T215F/Y	+	+
K219E/Q	-	-

Tabelle 9 A: Thymidinanaloga assoziierte Mutationen (mit + gekennzeichnet), die bei Patient 7 vor der Therapiepause (G₀) und in der Therapiepause (G₂) detektiert wurden.

Bei Patient #13 wurden vor der Pause M41L und T215Y detektiert. Diese beiden Mutationen waren in der Pause in G_{1A} (35 Tage in Therapiepause) nach wie vor nachweisbar, in dem zweiten Genotyp zu einem späteren Zeitpunkt (224 Tage in Therapiepause) in der Pause aber nicht mehr nachzuweisen. Dafür wurde als einzige Thymidinanalogonmutation eine K70R neu detektiert (Tab. 9 B).

Tymidinanaloga assoziierte Mutationen bei Pat. #13	G ₀	G _{1A}	G _{1B}
M41L	+	+	-
D67N	-	-	-
K70R	-	-	+
L210W	-	-	-
T215F/Y	+	+	-
K219E/Q	-	-	-

Tabelle 9 B: Thymidinanaloga assoziierte Mutationen (mit + gekennzeichnet), die bei Patient 13 vor der Therapiepause (G₀) und in der Therapiepause (G₂) detektiert wurden.

Bei dem dritten Patienten #25 gingen die vor der Pause nachgewiesenen Mutationen M41L, L210W und T215F zurück. Auch bei diesem Patienten konnte in der Pause das Auftreten der K70R beobachtet werden (Tab. 9 C).

Tymidinanaloga assoziierte Mutationen bei Pat.#25	G ₀	G ₁
M41L	+	-
D67N	-	-
K70R	-	+
L210W	+	-
T215F/Y	+	-
K219E/Q	-	-

Tabelle 9 C: Thymidinanaloga assoziierte Mutationen (mit + gekennzeichnet) die bei Patient 25 vor der Therapiepause (G₀) und in der Therapiepause (G₂) detektiert wurden.

In der Pause trat bei zwei dieser Patienten die K70R isoliert, ohne weitere TAM-Mutationen auf. Um zu überprüfen ob diese resistenten Stämme mit einer K70R bereits vor einer Therapiepause vorlagen, wurde ein *Realtime*-PCR Ansatz entwickelt, da mit der bisher verwendeten Methode der Direktsequenzierung nur Virusstämme detektiert werden konnten, die mehr als 20% der Gesamtpopulation ausmachten.

4.2 Minderheitendetektion mittels Echtzeit PCR

Um Virusstämme nachzuweisen, die einen geringeren Anteil als 20% der Viruspopulation eines Patienten ausmachen, musste eine sensitivere Nachweismethode entwickelt werden. Mit einer *Realtime*-PCR können einzelne Mutationen auf verschiedene Arten nachgewiesen. Dabei können Virusvarianten bis zu einem prozentualen Anteil von 0,2% detektiert werden. Die Methode mit der höchsten Sensitivität und Genauigkeit ist die Primerspezifische PCR, bei der zwei unterschiedliche Oligonukleotidpaare die gesamte Viruspopulation, bzw. nur die Populationen mit einer Mutation amplifizieren. Alternativ können auch mit Hybridisierungssonden und einer an die Amplifikation anschließenden Schmelzkurvenanalyse Minderheitenpopulationen nachgewiesen werden. Um diese Methoden zu etablieren und zu validieren mussten zunächst Standardplasmide hergestellt werden.

4.2.1 Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR

Der in PQE-30 UA inserierte Abschnitt des pol-Gens wurde nach PCR-Amplifikation mittels Sequenzierung als Wildtyp für Protease und Reverse Transkriptase bestätigt. Durch sequenzspezifische Mutagenese wurden Vektoren mit einer K70R, einer K103N und einer V82A Mutation hergestellt. Da im Fall von K70R sowohl das Triplet AGG, als auch ein AGA

für die resistente Variante kodieren, wurden beide Variationen hergestellt. Bei K103N wird die resistente Form durch AAC oder AAT kodiert, wofür ebenfalls zwei Plasmide hergestellt wurden. Für die V82A wurden vier unterschiedliche Plasmide mit den Codons, GCC, GCA, GCT, GCG produziert. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

4.2.2 Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT

Da bei Patienten in Therapiepause die resistenzassoziierte Mutation K70R neu detektiert wurde, sollte mit einem Minderheitenassay geklärt werden, ob bereits vor der Therapiepause Minderheitenpopulationen mit dieser resistenzassoziierten Mutation existierten.

Zunächst wurden Echtzeit PCRs mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotidpaaren entwickelt. Das erste Oligonukleotidpaar sollte Wildtyp und K70R Viren gleich gut amplifizieren während mit dem zweiten Oligonukleotidpaar nur Mutantenviren nachgewiesen werden sollten. Aus dem Quotienten von mutiertem Virus/Virusgesamtmenge x100 sollte der prozentuale Anteil der Mutante ermittelt werden. Mehrere Oligonukleotidkombinationen lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da in der Zielregion an benachbarten Nukleotidpositionen, die ebenfalls von dem Oligonukleotid gebunden wurden, vermehrt resistenzassoziierte Mutationen lagen. Durch Validierungsläufe mit Plasmiden, die Mutationen an den Aminosäurepositionen 67, 69, 71 und 77 aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass keine ausreichenden Bindungsunterschiede zwischen Mutante und Wildtyp erreicht wurden. Da die Zielsequenz der Oligonukleotide nur so gewählt werden konnte, dass auch umliegende resistenzassoziierte Mutationen auf das Bindeverhalten der Oligonukleotide Einfluss gehabt hätten, wurde ein alternativer *Realtime*-Ansatz gewählt. In diesem Versuchsansatz wurden zwei Hybridisierungssonden eingesetzt, die durch eine Schmelzkurvenanalyse eine Diskriminierung einzelner Virusstämme mit bzw. ohne Mutation erlaubten. Da aber auch hier benachbarte Mutationen das Ergebnis verfälschten, mussten die Sonden so entworfen werden, dass nur Änderungen an der Aminosäure 70 einen Einfluss auf das Schmelzverhalten der Sonden hatten. Dazu wurden die Nachbarpositionen mit so genannten „*locked nucleic acids*“ (LNAs) an drei Positionen stabilisiert. Zusätzlich diente eine der beiden Sonden gleichzeitig als Oligonukleotid (Abb. 15), was ein unterschiedliches Abschmelzen verhinderte. Mit diesen Modifikationen konnten die Probleme durch Sequenzabweichungen in der Oligonukleotidbindestelle ausgeräumt werden und eine sichere Diskriminierung von Stämmen mit K70R erreicht werden.

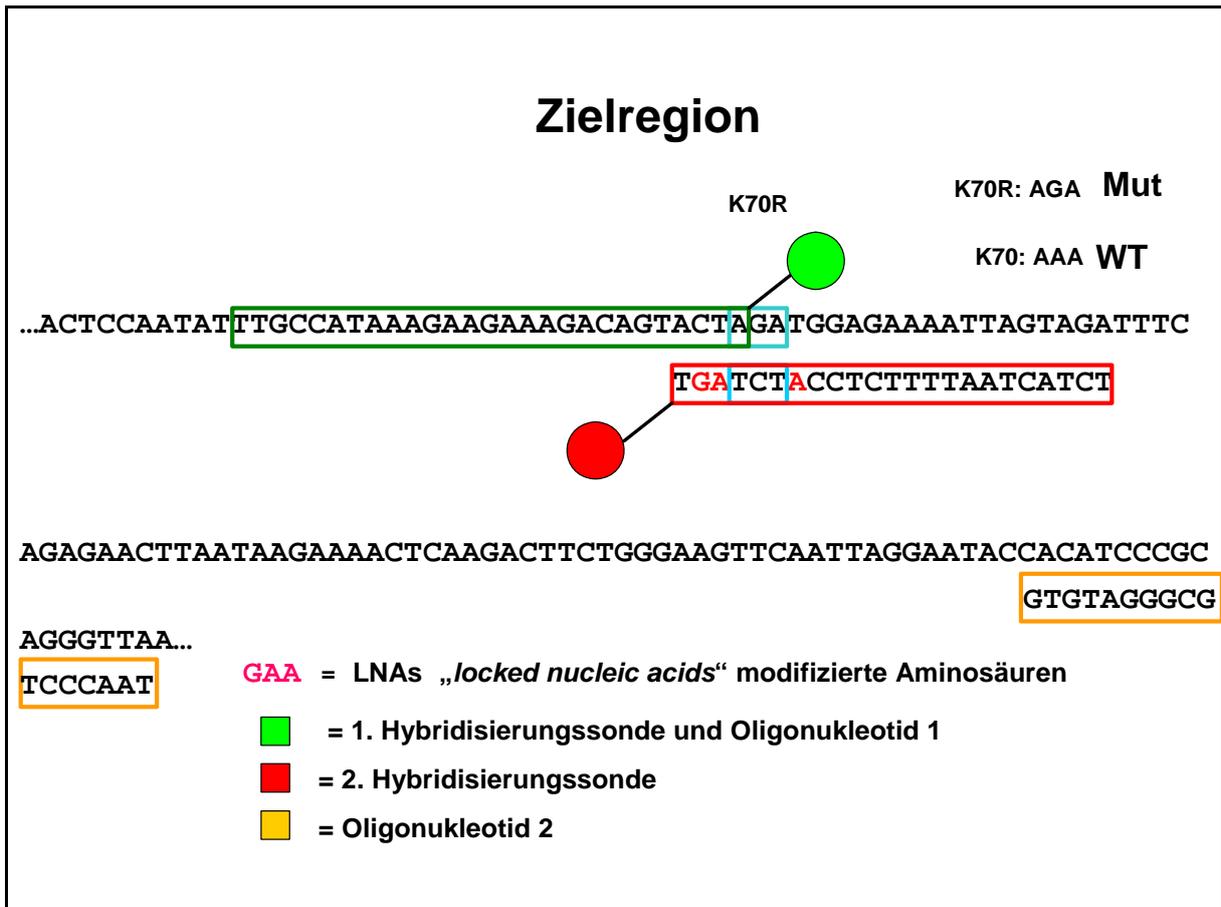


Abb. 15: Zielregion der K70R in der RT mit gebundenen Sonden und Oligonukleotiden

Die Sonden wurden 100% homolog zur mutierten Sequenz AGA bzw. alternativ zur Sequenz AGG entworfen. So war es möglich Viren mit Mutation in der Schmelzkurve durch eine höhere Abschmelztemperatur von Wildtypviren zu unterscheiden. In Abbildung 16 wird das Prinzip der Methode schematisch dargestellt.

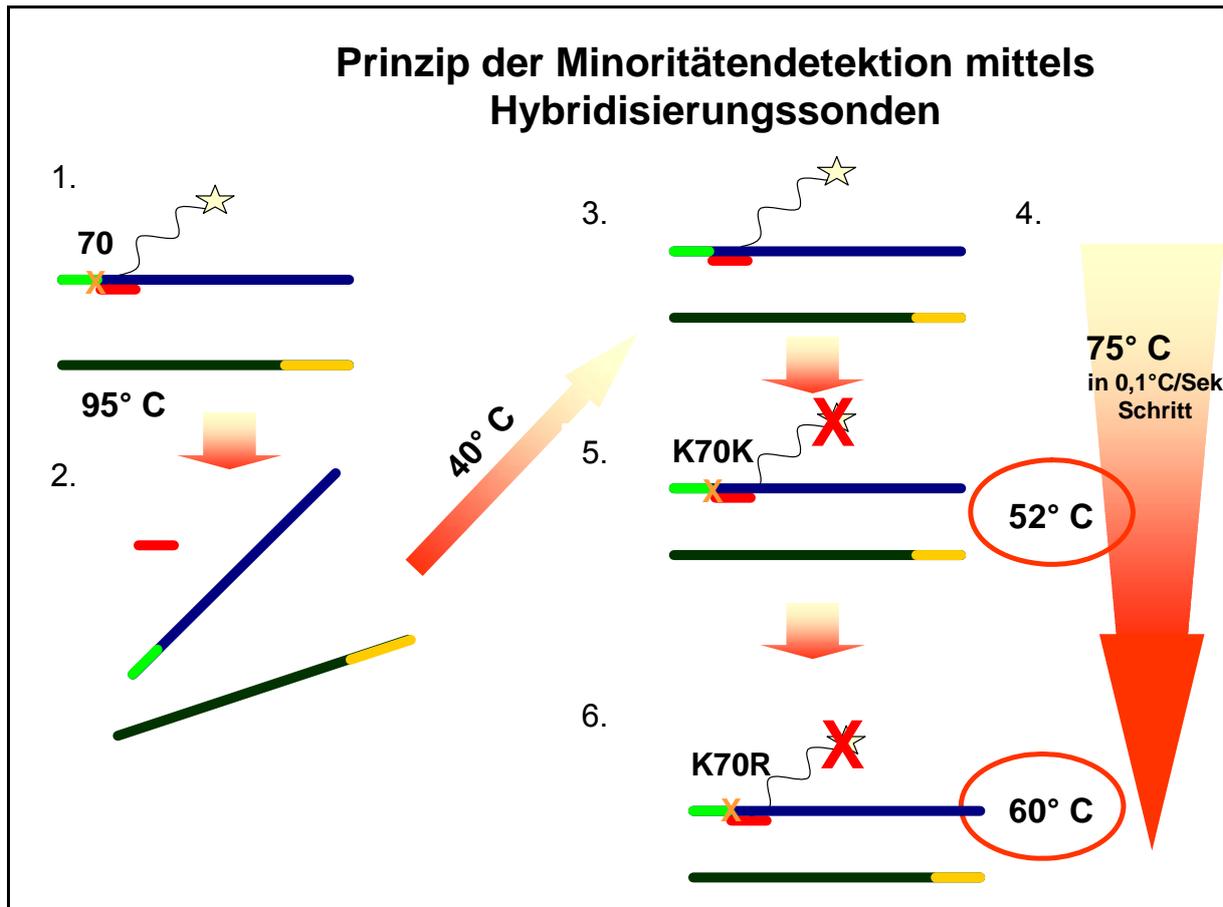


Abb. 16: Prinzip der Schmelzkurvenanalyse zur Detektion von K70R Viruspopulationen

1. Nach der Anlagerung der Oligonukleotide liegen die beiden Hybridisierungssonden als Doppelstrang vor und es kann eine Fluoreszenz bei 640 nm gemessen werden, die proportional zur Menge des Produktes ist.
2. Nach Erhitzen auf 95°C liegt das Produkt in Einzelsträngen vor und die Sonden haben sich abgelöst. Es kann keine Fluoreszenz gemessen werden.
3. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt auf 40°C , es liegt wieder ein doppelsträngiges Produkt mit gebundenen Sonden vor und damit ist auch wieder eine Fluoreszenz messbar.
4. Im nächsten entscheidenden Vorgang, wird die Temperatur kontinuierlich in $0,1^{\circ}\text{C}/\text{sek}$ Schritten auf 75°C erhöht und dauerhaft die Fluoreszenz gemessen.
5. Bei 55°C kommt es zum Abschmelzen der Sonde bei Virusstämmen mit einer Wildtypsequenz an dieser Position, und damit auch zu keiner messbaren Fluoreszenz.
6. Bei 60°C schmilzt die Sonde auch bei einem Template mit einer K70R ab.

Um mit einer Verdünnungsreihe von Standardplasmiden (WT- und K70R-Plasmid) eine Standardreihe herzustellen, mussten zunächst die Plasmidkonzentrationen auf 1 Mrd. Kopien pro μl eingestellt und abgeglichen werden. Dies geschah mit einer *Realtime*-PCR in der die Ampizillinkassette als Template diente. Mit einer Standardkurve eines bereits genau quantifizierten Plasmids konnten die Plasmide durch entsprechende Verdünnung auf eine bestimmte Kopienzahl/ μl eingestellt werden.

Ergebnisse

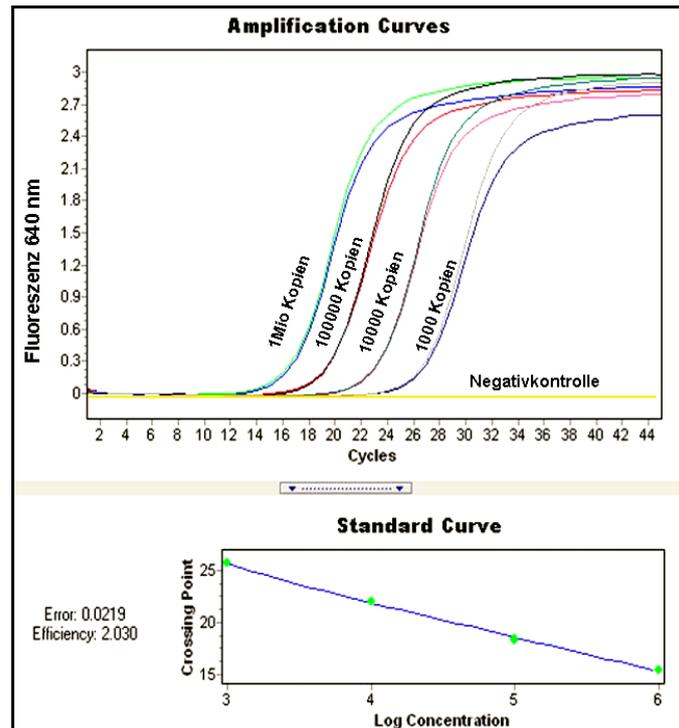


Abb. 17: Amplifikation und Standardkurve des K70R und des Wildtypplasmids mit 1.000, 10.000, 100.000 und 1 Mio. Kopien pro Ansatz

Sowohl das Wildtypplasmid, als auch das mutierte Plasmid konnten bei gleicher Kopienzahl mit gleich guter Effizienz amplifiziert werden (Abb. 17). In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse konnte deutlich gezeigt werden, dass bei den Plasmiden mit Wildtypsequenz ein Fluoreszenzpeak bei 52° C zu sehen war und ein Abschmelzen der Varianten mit Mutation erst bei 60° C detektiert wurde. Eine Mischung von beiden Plasmiden zu gleichen Teilen zeigte zwei Peaks bei 52° C und 60° C (Abb. 18).

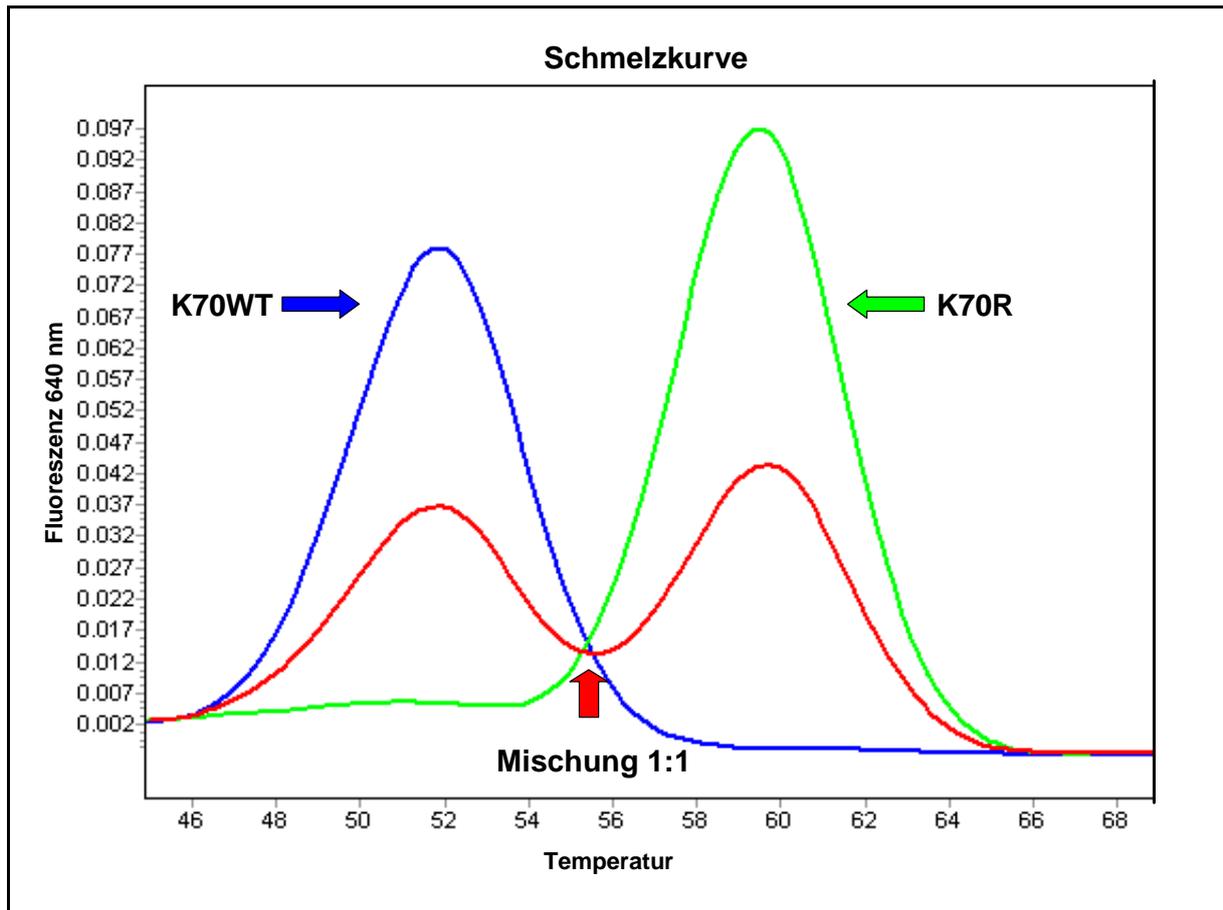


Abb. 18: Schmelzkurve der Standardplasmide mit Wildtypsequenz (10.000 Kopien) und des mutierten Plasmids mit K70R (10.000 Kopien) und eine Mischung im Verhältnis 1:1 (je 5.000 Kopien)

Um zum einen die Sensitivität dieses Assays zu überprüfen und zum anderen die Möglichkeit, mit dieser Methode in Plasmidmischungen sowohl Wildtypviren als auch mutierte Varianten zu erkennen, wurden die Plasmide mit und ohne Mutation in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, amplifiziert und eine Schmelzkurve erstellt (Abb. 19). Es war möglich sowohl Wildtypvarianten, als auch Mutantenpopulationen, die anteilig 5% der Mischung ausmachten, noch eindeutig als Peak in der Schmelzkurve zu identifizieren. Damit konnte eine Nachweisgrenze von minoren Populationen von 5% erreicht werden.

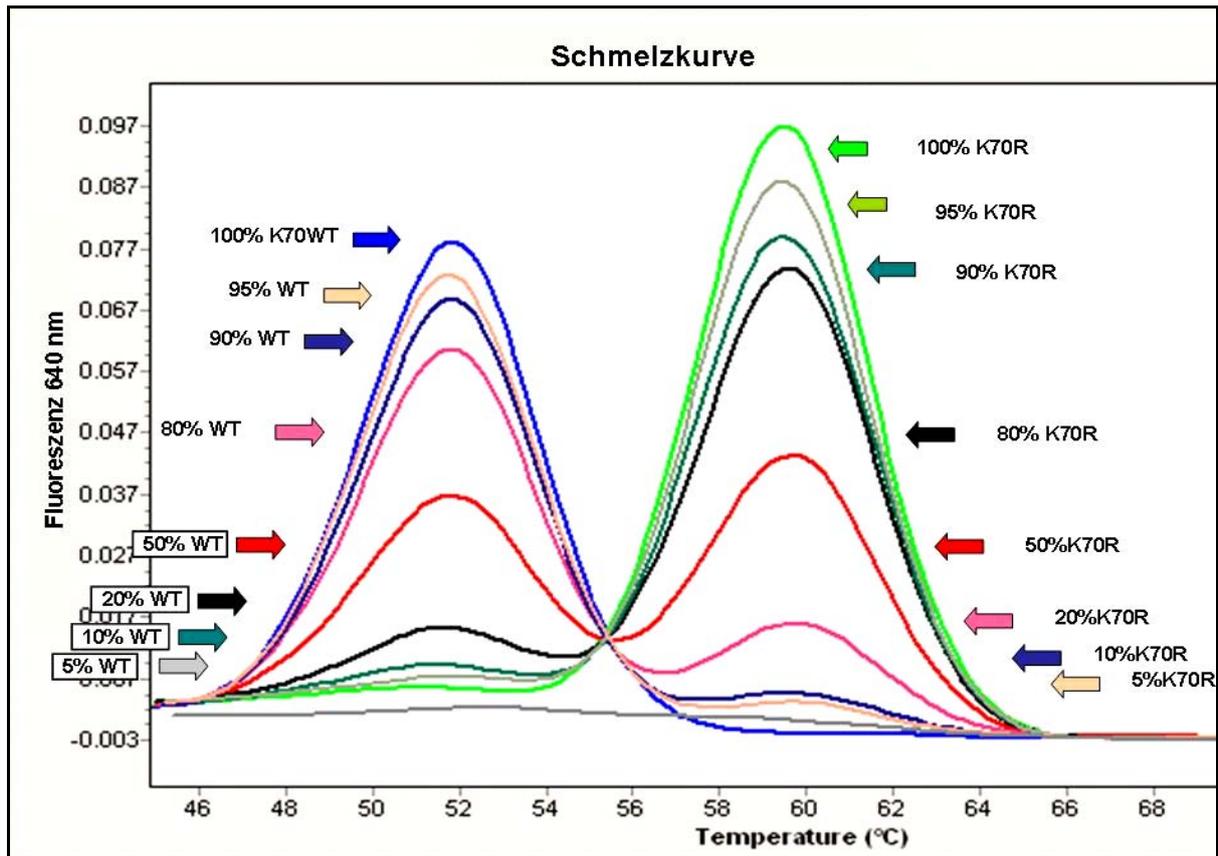


Abb. 19: Schmelzkurve unterschiedlicher Mischungen von Wildtypplasmiden und Plasmiden mit K70R Mutation zur Ermittlung der Sensitivität
 Es wurden immer insgesamt 10.000 Kopien pro Ansatz eingesetzt.

Nach Validierung mit Standardplasmiden wurde diese Methode eingesetzt, um zu überprüfen, wie sich das anteilige Verhältnis von Mutationen unter selektiven Bedingungen, z.B. einer Therapiepause verändert. Es wurden vier chronologisch aufeinander folgende Proben eines Patienten untersucht, der seine Therapie abgesetzt hatte. Dazu wurde RNA isoliert, mittels RT-PCR in DNA umgeschrieben und vervielfältigt. 2 µl des entstandenen PCR-Produkts dienten als Matrize für die *Realtime*-Reaktion. Die erste Probe vor Therapiepause zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt eine reine resistente Population im Minderheitenassay detektiert werden konnte.

In Abb. 20 sieht man parallel die Ergebnisse der Direktsequenzierung, bei der ebenfalls in zwei analysierten Fragmenten nur Populationen mit resistenten Varianten (K70R) detektiert wurden. Nach 36 Tagen Therapiepause hat der fehlende selektive Druck noch zu keinen Änderungen des Resistenzprofils führt. Sowohl in der Minderheitendetektion als auch bei Direktsequenzierung war immer noch eine rein resistente Population zu sehen.

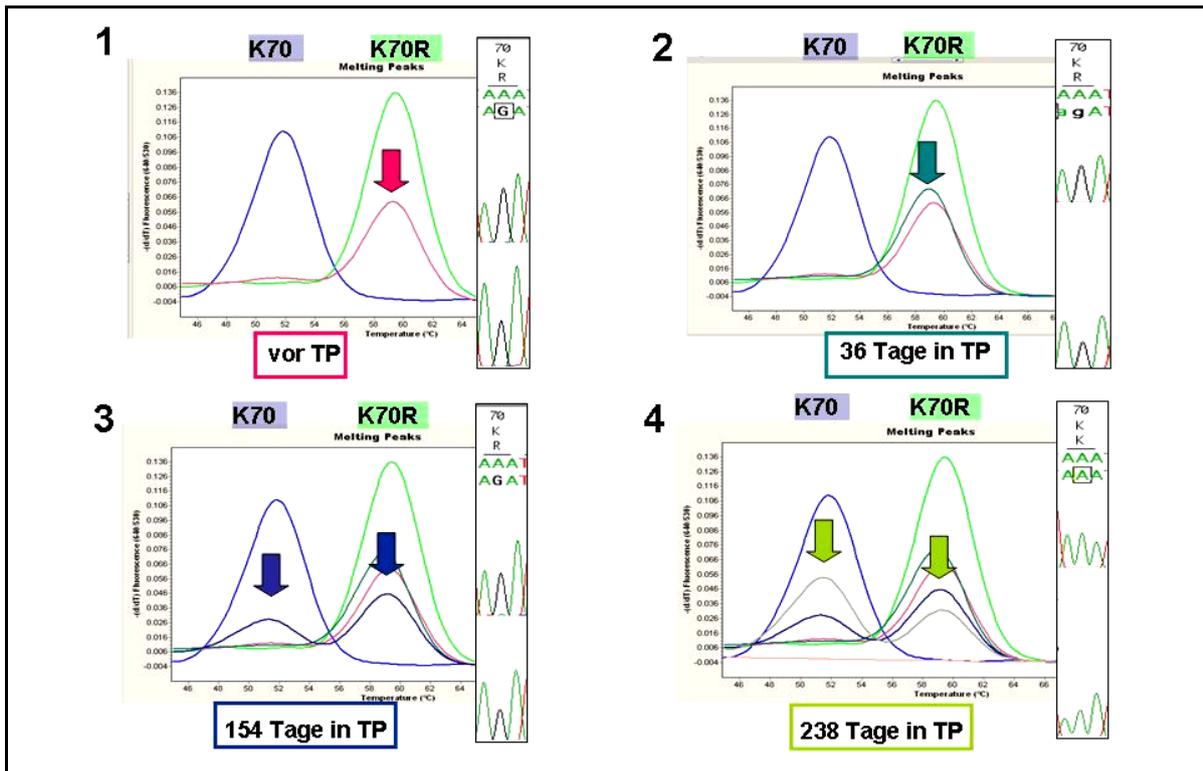


Abb. 20: Schmelzkurven und Ergebnisse der Direktsequenzierung eines Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vor und in einer Therapiepause

1. Schmelzkurve vor Therapiepause mit den beiden Standardplasmiden (blau WT und grün K70R Kurve) und der roten Kurve, die die Patientenviruspopulation darstellt in der nur Viren mit Mutation K70R nachzuweisen sind. Im Vergleich dazu zwei Fragmente der Direktsequenzierung mit Referenzsequenz, die auch eine reine resistente K70R Population darstellen.
2. Schmelzkurve nach 36 Tagen in Therapiepause mit den beiden Standardplasmiden (blaue WT und grüne K70R Kurve), der roten Kurve (Probe vor Therapiepause) und der aktuellen grünen Kurve mit einer nach wie vor resistenten Viruspopulation. In der Direktsequenzierung sind ebenfalls nur Virusvarianten mit K70R nachzuweisen.
3. Schmelzkurve nach 154 Tagen Therapiepause. Die dunkelblaue Kurve zeigt, dass eine Mischpopulation von resistenten- und Wildtyp-Varianten nachzuweisen ist. Dahingegen ist in der Direktsequenzierung nur die resistente Population zu sehen.
4. Nach 238 Tagen Therapiepause zeigt sich in der Minoritätenanalyse eine Mischpopulation von resistenten und Wildtypviren. In der Direktsequenzierung wird eine reine Wildtyppopulation detektiert.

Auch nach 154 Tagen in Pause konnte mit der Direktsequenzierung weiterhin nur eine reine K70R Population detektiert werden. Dagegen konnte der deutlich sensitivere Minderheiten-assay schon eine Mischpopulation mit einem erhöhten Anteil Wildtyp-Viren finden. Nach 238 Tagen in Therapiepause wurde mit der Direktsequenzierung nur die Wildtyppopulation mit einem Anteil von etwas weniger als 20% detektiert, wohingegen im sensitiven Minderheiten-assay die resistente Virusvariante noch nachgewiesen werden konnte.

Für die Analyse der drei Patienten, bei denen in der Therapiepause eine K70R neu nachweisbar war, wurden Proben verwendet, die vor Therapiepause entnommen wurden. Eine der drei Proben konnte trotz mehrmaliger Wiederholung nicht amplifiziert werden. Die zweite Probe konnte nicht analysiert werden, da nicht genügend Material zur RNA Isolierung zur Verfügung stand. Trotz eines Amplifikationsprodukts der dritten Patientenprobe verhinderten in der *Realtime*-PCR Nebenpeaks in der Schmelzkurve eine eindeutige

Aussage (Abb. 21). Daher konnten keine bestätigenden oder widerlegenden Erkenntnisse über die Herkunft der K70R bei diesen drei Patienten in der Pause gewonnen werden.

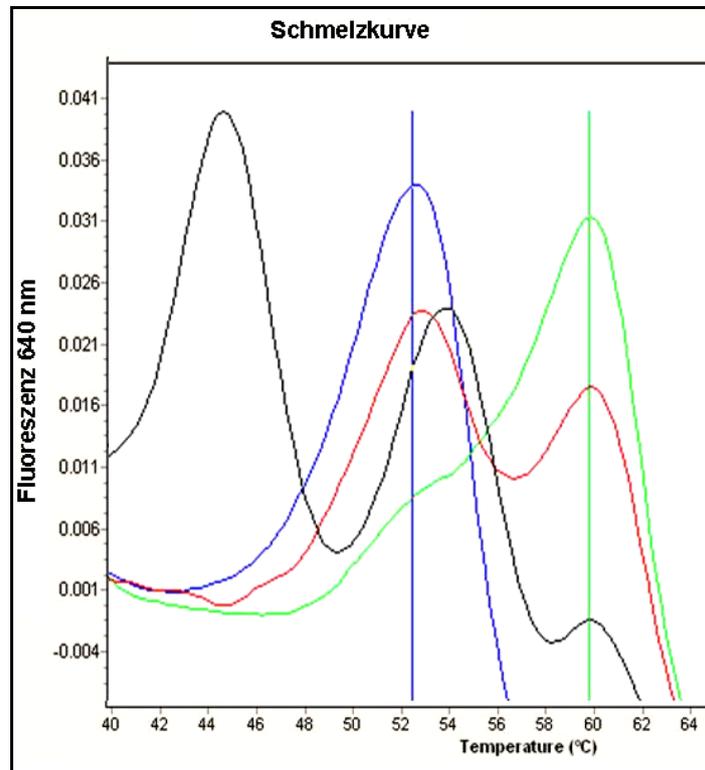


Abb. 21: Schmelzkurve eines Patienten bei dem in der Pause eine K70R auftauchte

Die hier analysierte Probe wurde vor der Therapiepause entnommen. Blaue Hilfslinie: Abschmelztemperatur der Wildtypvariante, grüne Hilfslinie: Abschmelztemperatur der Varianten mit K103N Mutation

Blaue Kurve= Standard K70WT

Grüne Kurve= Standard K70R

Rote Kurve= Mischung Standardplasmide 1:1

Schwarze Kurve= Patientenprobe

4.2.3 Nachweis und Analyse von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103 (Patientenkollektiv 3)

Resistenz determinierende Mutationen spielen nicht nur bei Patienten in Therapiepause im Bezug auf das Ansprechen einer Folgetherapie eine Rolle. Auch bei therapie-naiven Patienten können Resistenzen durch die Infektion mit resistenten Viren übertragen worden sein, was das Therapieansprechen stark beeinflussen kann. Daher wurde in einem dritten Patientenkollektiv mit 159 therapie-naiven Patienten eine Direktsequenzierung vor Beginn der Primärtherapie durchgeführt. Parallel wurde für die NNRTI assoziierte Mutation K103N eine Assay zum Nachweis von Minderheitenpopulationen entwickelt.

4.2.3.1 Patientencharakteristika

In der Studie wurden 130 Männer und 29 Frauen untersucht. Das mediane Alter der Patienten betrug 37 Jahre (20-66 Jahre) und sie waren median seit 0,25 Jahren infiziert (0-

18 Jahre). Das Virus von 127 Patienten wies, klassifiziert nach geno2pheno, einen HIV-1 Subtyp B auf (80%) und bei 32 Patienten wurde ein HIV-1 non B Subtyp identifiziert. Alle Patienten waren zur Zeit der Probenentnahme therapienaiv und 121 dieser Patienten begannen kurz danach eine Therapie während die übrigen 38 therapienaiv blieben oder keine Folgedaten vorhanden waren. Um ein Ansprechen oder Versagen der Therapie zu überprüfen, wurde die Viruslast 12 Wochen nach Therapiebeginn gemessen.

4.2.3.2 Genotypischer Resistenztest

Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI) assoziierte Mutationen wurden bei 10,7% der Patienten (17/159) mit der Methode der Direktsequenzierung detektiert (Abb. 22).

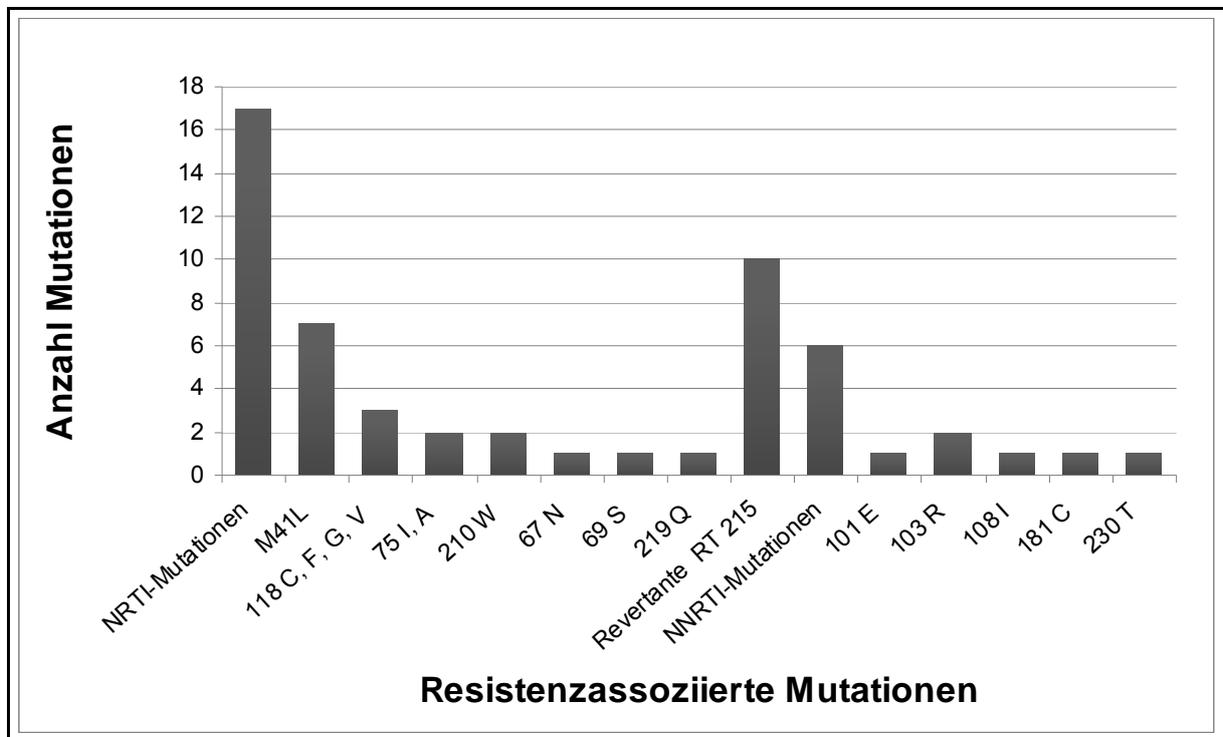


Abb. 22: Anzahl resistenzassoziierter Mutationen bei dem Patientenkollektiv von 159 therapienaiven Patienten

Der Nachweis erfolgte durch Direktsequenzierung.

Die höchste Prävalenz wies mit 4,4% bei den NRTIs die M41L auf (7/159). Bei 6,3% (10/159) konnte eine Revertante an der Aminosäureposition 215 der RT nachgewiesen werden. Bei sechs Patienten (3,8%) wurden NNRTI assoziierte Mutationen gefunden. Die Mutation K103N war bei keinem dieser Patienten nachweisbar.

4.2.3.3 Konstruktion von Standard- und Kontrollplasmiden zur Quantifizierung der Viruspopulationen

Zur Quantifizierung des Wildtyps (wt) und der Mutante wurden als Referenz drei Plasmide hergestellt. Für die wt-Kontrolle wurde ein 1505 bp großes PCR-Produkt des *pol*-Gens eines wt-HIV-1 Stamms wie vom Hersteller beschrieben (QIAGEN) in den pQE30-UA Vector kloniert.

Der Austausch von einem Lysin zu einem Asparagin beruht auf Codonebene auf der Transversion von AAA zu AAC oder AAT. Es wurden zwei Plasmide, die jeweils eine dieser Mutationen aufwiesen, mittels sequenzspezifischer Mutagenese nach dem Standardprotokoll (STRATAGENE, USA) hergestellt.

4.2.3.4 Selektive *Realtime*-PCR zur Detektion des Anteils an Wildtypvirus mit Wildtypvirus und Virusstämmen mit K103N Mutation

Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurde das bereits oben beschriebene RT-PCR Produkt des *pol*-Gens verwendet. Um in einer Probe den Anteil an Viruspopulation mit K103N zu ermitteln, wurden zwei bereits beschriebene Oligonukleotidpaare verwendet. Zum Nachweis des Produkts diente eine TaqMan-Sonde (Lecossier et al., 2005) (Abb. 23). Mit dem ersten Oligonukleotidpaar und einer definierten Standardreihe von 10^7 bis 10^2 Kopien konnte aufgrund des Schwellenwertes (CT-Wert: „*Threshold-Cycle*“), der den Übergang in die exponentielle Amplifikationsphase angibt und proportional zur Virusmenge ist, die Gesamtmenge Virus in einer Probe ermittelt werden. Auf die gleiche Weise wurde mit dem zweiten Oligonukleotidpaar der Anteil an Mutante detektiert. Dafür wurde das zweite Oligonukleotidpaar so entworfen, dass eine effiziente Bindung nur bei der entsprechenden Mutante möglich war (Abb. 23).

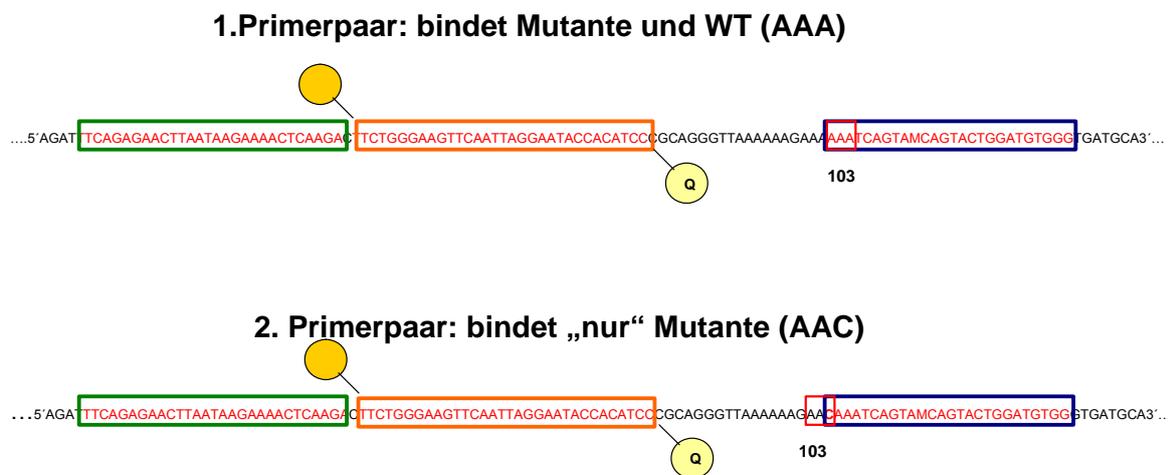


Abb. 23: Schematische Darstellung der Zielregion des primerspezifischen Minoritätenassays
Gebundenen Oligonukleotiden (grün, blau), die TaqMan-Sonde, die nach der Amplifikation ein spezifisches Fluoreszenzsignal abgibt (gelb) und Aminosäureposition 103 (rot). Das Oligonukleotiddesign wurde aus (Lecossier et al., 2005) übernommen und auf dem Light Cycler System etabliert.

Ergebnisse

Die Formel $(\text{Menge Mutante} / \text{Menge Gesamtvirus}) \times 100$ gibt den prozentualen Anteil der Viruspopulation mit K103N-Mutation an. Sowohl das WT-Plasmid, als auch das K103N-Plasmid wurden gleich gut mit dem ersten Oligonukleotidpaar amplifiziert. Das WT-Plasmid wurde mit dem zweiten Oligonukleotidpaar mit einer geringen Effizienz amplifiziert. Dies zeigte sich dadurch, dass die Amplifikation des WT-Plasmids (Amplifikationskontrolle) zwölf Zyklen später erfolgte, als die Amplifikation des Plasmids mit Mutation (Abb. 24).

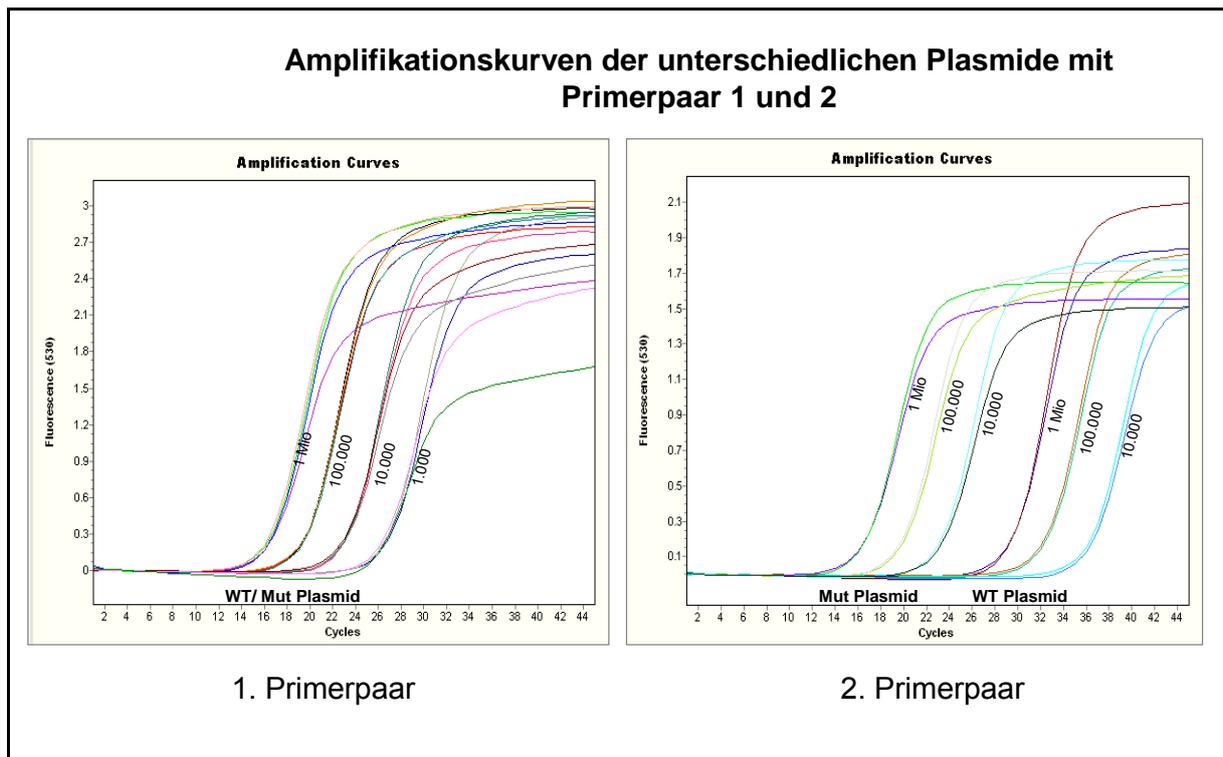


Abb. 24: Amplifikationskurven von Wildtyp- und Mutantenplasmid K103N

Die Amplifikation unterschiedlicher Verdünnungen der Standardplasmide mit einem Real-Time-PCR-Assay (1. Oligonukleotidpaar: 1.000, 10.000, 100.000, 1 Mio. Kopien/ μ l und 2. Oligonukleotidpaar: 10.000, 100.000, 1 Mio. Kopien/ μ l) mit zwei verschiedenen Oligonukleotidpaaren.

Bei der PCR mit dem 2. Primerpaar wurden nur die Amplifikationssignale als „echte“ Minderheit akzeptiert, die früher als die Amplifikationskontrolle auftraten. Das System wurde mit Mischungen von Standardplasmiden validiert (Abb. 25). Eine Doppelbestimmung der Standards wurde in jedem Lauf vorgenommen und die Werte wurden in drei unabhängigen Läufen bestätigt. Die Effekte einer K103R Mutation, sowie anderer Mutationen an der Primerbindestelle wurden mit unterschiedlichen Plasmiden überprüft.

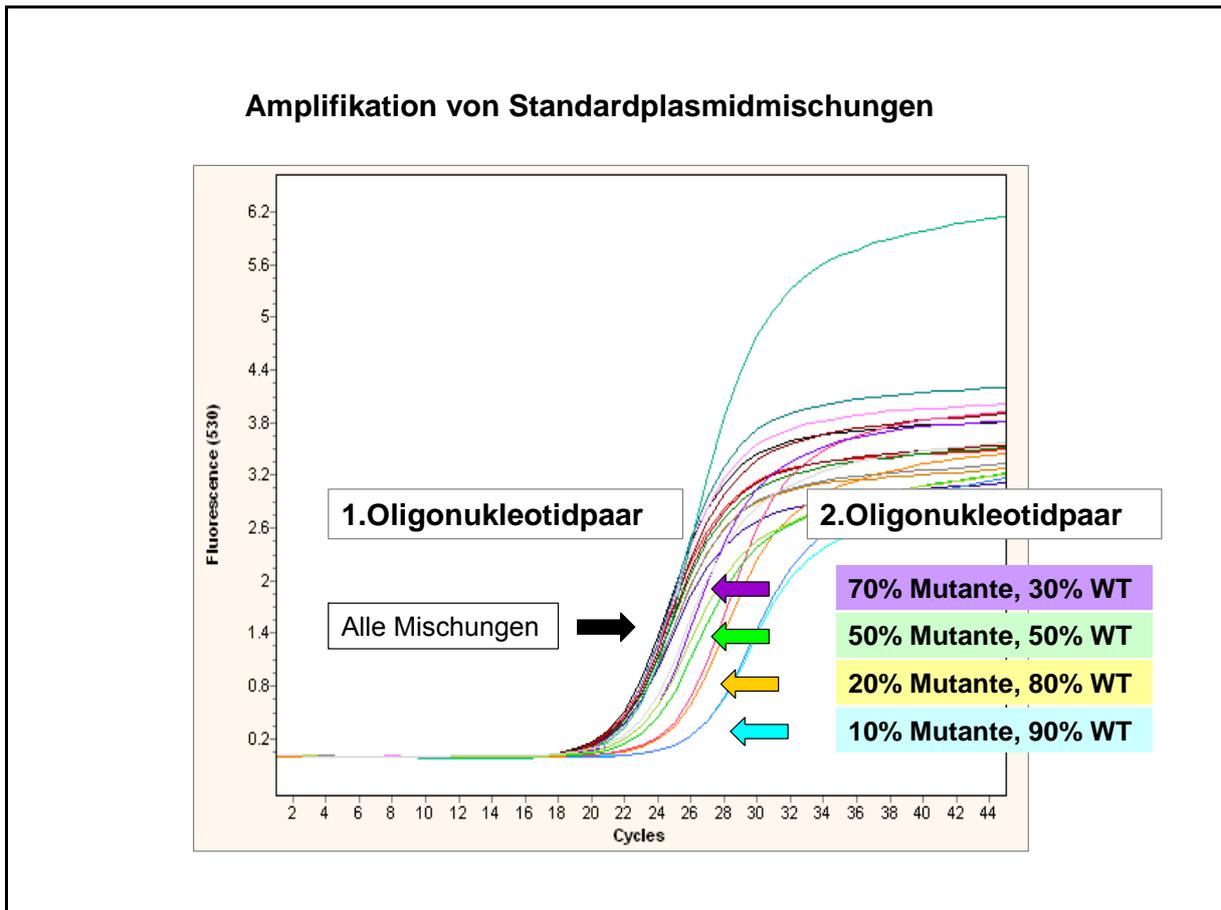


Abb.25: Amplifikationskurven von Plasmidmischungen

70% Mutante mit 30% WT, 50% Mutante mit 50% WT, 20% Mutante mit 80% WT, 10% Mutante mit 90% WT mit jeweils 10.000 Kopien/ μ l wurden mit beiden Oligonukleotidpaaren amplifiziert.

4.2.3.5 Minoritätendetektion an Aminosäureposition 103 der RT

Die K103N Minderheit wurde weitaus häufiger bei Patienten gefunden, die einen HIV-1 non-B Subtyp aufwiesen (13/32, 40,6%). Im Gegensatz dazu lag die Häufigkeit bei Patienten mit einem HIV-1 Subtyp B bei 15% (19/127). Dies entspricht einer signifikanten Korrelation von $p=0,0025$ bezüglich der Patienten mit einem non-B Subtyp und einer K103N Minoritätenpopulation. Die Klassifizierung der non-B Subtypen ist der Abbildung 26 zu entnehmen. Aufgrund der geringen Fallzahl können für einzelne Subtypen keine genauen Aussagen getroffen werden, obwohl bei bestimmten Subtypen diese Variante häufiger aufzutreten scheint.

Ergebnisse

Patienten Nummer	Anteil Minorität %	Therapieversagen	Patienten Nummer	Anteil Minorität %	Therapieversagen
14	0.20		5	0.31	
23	0.20	+	29	0.32	
25	0.20		26	0.33	
8	0.21		9	0.33	
17	0.21		12	0.33	
32	0.21		30	0.33	
18	0.22		13	0.34	
24	0.22	+	31	0.34	
6	0.23		15	0.36	+
10	0.23		27	0.41	
21	0.23		7	0.47	
1	0.23		22	0.52	
28	0.24		20	2.41	
2	0.25		16	3.20	
4	0.26		3	8.62	
11	0.30		19	13.00	+

Tabelle 10: Anteil K103N Minorität (ansteigend geordnet) bei 32 Patienten mit nachgewiesener Minderheit und Aussage über ein Therapieversagen nach 12 Wochen
Die Minderheiten wurden in einer Probe vor Therapiebeginn analysiert.

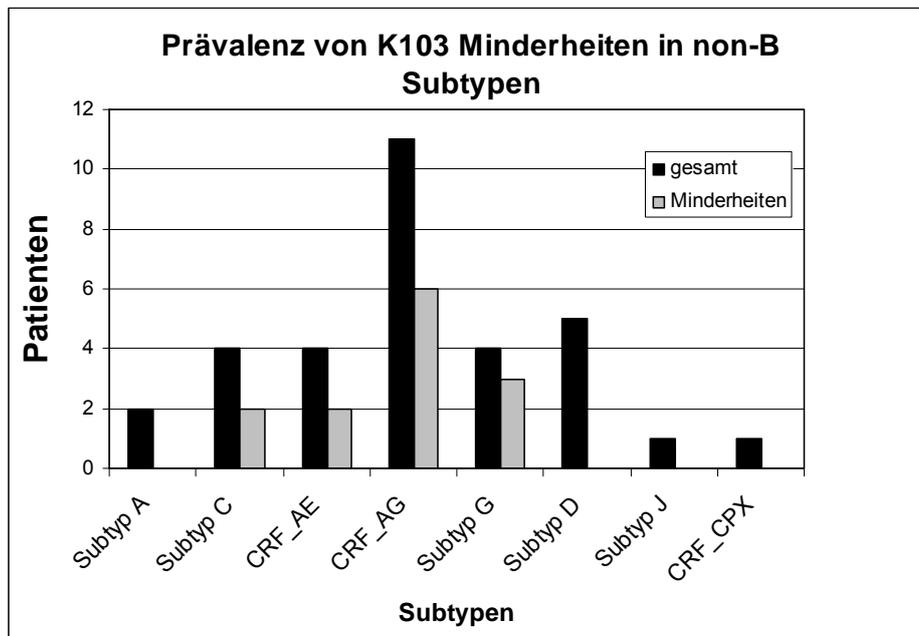


Abb. 26: Prävalenz einer K103N Minderheitenpopulation unterschiedlicher non-B Subtypen im Patientenkollektiv der 159 Patienten
Die schwarzen Balken zeigen die Verteilung der non-B Virussubtypen im gesamten Kollektiv und die grauen Balken die Virustypen der Patienten, bei denen eine K103N Minderheit nachgewiesen wurde.

4.2.3.6 Primärtherapie und virologisches Ansprechen

Alle 121 Patienten, die eine HAART begannen, wurden mit einem NRTI-haltigen Regime behandelt. Bei 118 Patienten bestand dieses Regime aus zwei NRTIs (64% Zidovudin (AZT) + Lamivudin (3TC); 26.0% Tenofovir (TDF) + Emtricitabine (FTC) oder 3TC; 7,5% nahmen zwei andere NRTIs ein). Die Zusatzmedikation von 84 Patienten (69%) war ein NNRTI und 28 Patienten (23%) bekamen einen Protease Inhibitor (PI) als drittes antiretrovirales Medikament. Die übrigen neun Patienten (8%) nahmen einen weiteren NRTI oder kein zusätzliches Medikament ein. Das Therapieregime wurde nach den Ergebnissen eines genotypischen Resistenztests des *pol*-Gens ausgewählt. Bei 27 der 121 Patienten (22%) zeigte sich ein Versagen der Primärtherapie mit einer medianen Viruslast von 351 Kopien/ml (von 70-50.000 Kopien/ml).

Die Patienten wurden zu einer detaillierten Auswertung in zwei Gruppen eingeteilt, Patienten mit Minorität (n=21) und Patienten ohne Minorität (n=100). Da die K103N eine NNRTI assoziierte Mutation ist, wurden in diesen beiden Gruppen die Patienten mit einer NNRTI haltigen Therapie genauer untersucht. Bei den Patienten mit Minorität bekamen 76% (17/21) einen NNRTI, von denen vier Patienten (24%) ein Therapieversagen zeigten (Tabelle 10 und 11). In der Gruppe ohne Minorität versagten 15% (zehn Patienten) der 67 Patienten, die mit NNRTI behandelt wurden (p=0,3). Bei keinem Patienten aus der Minoritätengruppe konnten in der majoren Population therapierelevante Mutationen detektiert werden. Bei einem Patienten aus der Gruppe ohne Minorität konnte in der Direktsequenzierung der Reversen Transkriptase zusätzlich eine AZT relevante M41L nachgewiesen werden, die aber alleine nur eine geringere Auswirkung auf die Wirksamkeit von AZT hat. Nach dem Therapieversagen konnte bei den meisten Patienten aufgrund einer Viruslast von weniger als 1.000 Kopien/ml keine Direktsequenzierung durchgeführt werden. Ein virologisches Versagen trat bei drei Patienten in der Minoritätengruppe mit einem geringen Anteil an K103N auf (Pat. #23, #24 und #15) während bei einem Patienten (Patient #19) ein relativ hoher Anteil Mutation gemessen wurde (Tabelle 10). Aufgrund des prozentualen Anteils der Minorität war daher keine Aussage über das Versagen einer Therapie möglich und es konnte kein Grenzwert ermittelt werden, ab dem es zu einem Versagen der Therapie mit einer K103N Minderheit kommt.

	NNRTI-haltige Therapie			keine NNRTI-haltige Therapie		
	Erfolg	Versagen	% Versagen	Erfolg	Versagen	% Versagen
K103N Minorität	13	4	24	4	0	0
keine K103N Minorität	57	10	15	20	13	40

Tabelle 11: Therapieversagen bei 121 Patienten nach 12 Wochen Therapie mit einem NNRTI-haltigen oder keinem NNRTI-haltigem Therapieregime mit und ohne nachweisbare K103N Minorität

4.2.4 Analyse und Auswirkungen von Minderheitenpopulationen an Position V82A der Protease

Das Versagen einer Primärtherapie mit einem Lopinavir-haltigen Medikamentenregime bei therapie-naiven Patienten ist sehr ungewöhnlich und in der Literatur bisher nur in zwei Fällen beschrieben (Conradie et al., 2004; Friend et al., 2004). In Studien zu LPV/r in der Primärtherapie traten bislang keine spezifischen PI-Mutationen auf. Bei einem Patienten aus dem RESINA-Kollektiv kam es unter der Primärtherapie mit Lopinavir, AZT und 3TC zu einem Therapieversagen. Anhand des Genotyps sollte geklärt werden, ob resistenz-assoziierte Mutationen zu diesem Versagen beitragen. Der Patient war ein 41 Jahre alter Schwarzafrikaner aus Togo, bei dem 2003 eine HIV-1 Infektion diagnostiziert wurde. Die CD4-Zellzahl zu Therapiebeginn betrug 42 Zellen/ μ l (5%) mit einer Viruslast von 166.351 Kopien/ml. Aufgrund von opportunistischen Infektionen und des schlechten Immunstatus wurde im Mai 2003 eine antiretrovirale Therapie mit AZT, 3TC und LPV/r begonnen. Ein Resistenztest vor Beginn der Therapie zeigte keine resistenzassoziierten Mutationen in der PR und RT, sondern nur eine Revertante T215C in der RT, die auf übertragene resistente Virusstämme hindeutet. Nach Versagen der Therapie im Dezember 2004 konnten im Resistenztest sowohl die Protease Mutationen L10V, M36I und V82A als auch Reverse Transkriptase Mutationen M184V und T215Y detektiert werden (Abb. 27).

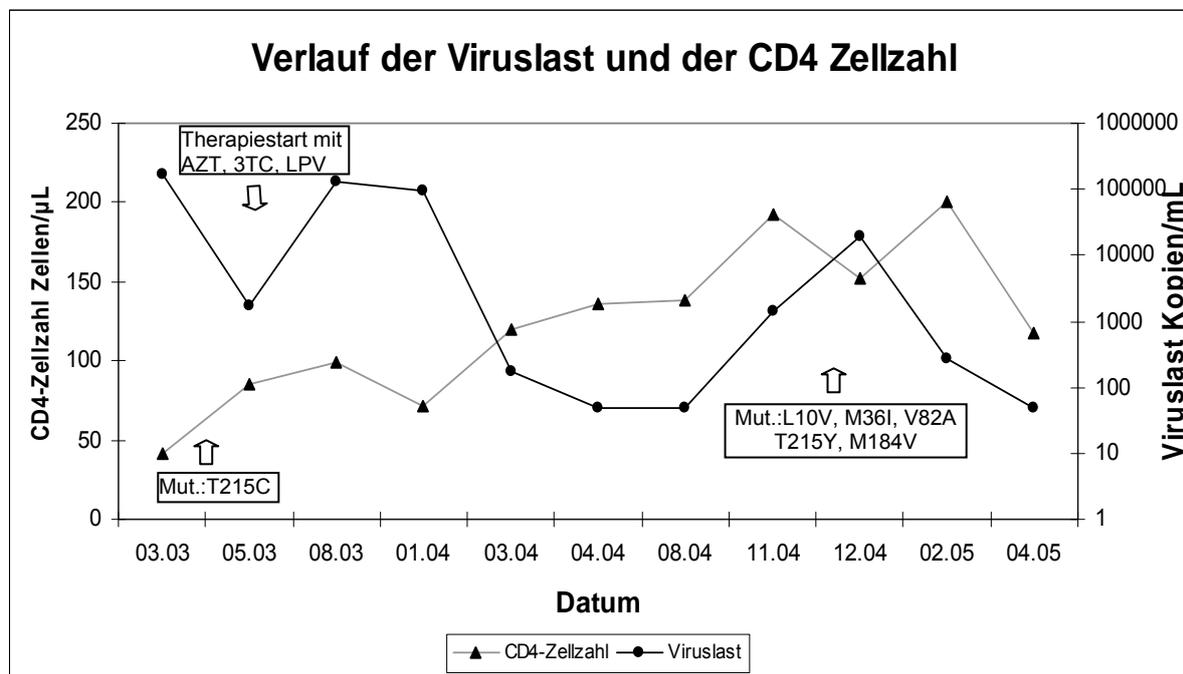


Abb. 27: Chronologischer Verlauf der Viruslast und CD4-Zellzahl eines Patienten mit Primärtherapieversagen

Zusätzlich eingetragen sind die resistenzassoziierten Mutationen, die zu der entsprechenden Zeit gefunden wurden und der Therapiestart mit AZT, 3TC, LPV.

Das Versagen von 3TC ist mit der Mutation M184V zu erklären. Die Mutation T215Y resultiert in einer Einschränkung der Wirksamkeit von AZT. Die T215Y bildet sich leichter aus

der Revertante T215C als aus der Wildtypvariante T215. Eine Mutation an der Position 82 hat möglicherweise einen Einfluss auf die phänotypische Resistenzlage gegenüber Lopinavir (Parkin et al., 2003). Auch in einem der bereits oben erwähnten Fälle einer LPV Resistenz war das virologische Versagen unter LPV mit dem vorübergehenden Auftreten der Mutation V82A, gefolgt von den Mutationen V32I, M46M/I und I47A, verbunden (Friend et al., 2004). Um zu klären, ob diese Resistenz neu entstanden oder bereits übertragen war, wurde ein Minderheitenassay etabliert. Um Mutante und Wildtyp zu amplifizieren, wurden zwei Oligonukleotidpaare (Hance et al., 2001) genutzt, mit denen in Patientenproben Mischpopulationen von 0,2% Mutante oder Wildtyp sicher nachgewiesen werden konnten. Vom Prinzip der Methode ist der Assay vergleichbar mit der oben beschriebenen K103N-Minoritätendetektion. Mit Verdünnungsreihen von Plasmiden mit und ohne Mutation wurde mit beiden Oligonukleotidpaaren eine selektive PCR durchgeführt. Die Methode wurde mit Standardplasmidmischungen validiert und so konnte die Sensitivität von 0,2% bestätigt werden. Aufgrund des CT-Werts der Patientenprobe und des Vergleichs zu den entsprechenden Standardplasmiden konnte die Gesamtvirusmenge und Mutantenvirusmenge quantitativ erfasst werden und der Anteil V82A haltiger Viren berechnet werden. Es zeigte sich durch dreifache unabhängige Bestätigung, dass 2,4% Mutantenpopulation bereits vor Therapie nachweisbar war (Tabelle 12).

Lauf	Menge Virus mit V82A	Menge Gesamtvirus	% V82A
Lauf 1	1,27 E4 Viren/Ansatz	6,63 E5 Viren/Ansatz	1,92
Lauf 2	1,38 E4 Viren/Ansatz	6,36 E5 Viren/Ansatz	2,67
Lauf 3	1,38 E4 Viren/Ansatz	4,23 E5 Viren/Ansatz	2,69
Mittelwert			2,42

Tabelle 12: Erfasste Virusgesamtmenge und Menge der Viren mit V82A in drei unabhängigen *Realtime* Läufen mit dem daraus errechneten Anteil Minorität.

5 Diskussion

5.1 Therapiepause

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen prädominanter HIV-Stämme in einer Therapiepause untersucht, um die Evolution resistenzassoziierter Mutationen unter fehlendem Medikamentendruck zu analysieren. Aufgrund der hohen Replikations- und Mutationsrate von HIV kommt es zu einer gesteigerten Populationsdynamik und zur gleichzeitigen Existenz mehrerer Viruspopulationen (Quasispezies) bei einem Patienten (Domingo et al., 2001). Bei Patienten, die schon über einen langen Zeitraum mit antiretroviralen Medikamenten behandelt wurden, sind Stämme mit hoher Kreuzresistenz entstanden, die nur noch geringe Sensitivität gegenüber Medikamenten zeigen, daher standen vor der Therapieunterbrechung nur wenige Therapieoptionen zur Verfügung. Um den Effekt des wegfallenden Selektionsdruck der Medikamente auf die Entwicklung des prädominanten Virusstamms nachzuvollziehen wurden Sequenzanalysen vor, während und bei einigen Patienten auch unter der Folgetherapie durchgeführt. Die Patienten unterbrachen nicht strukturiert ihre Therapie, sondern hatten eigenmächtig die Medikamente abgesetzt. Grundsätzlich wurde in beiden Kollektiven sowohl ein Rückgang von resistenzassozierten Mutationen beobachtet, als auch neue Mutationen in der Pause detektiert, deren Ursprung zu klären war.

Die Evolution von resistenzassozierten Mutationen während und nach der Therapiepause bei den stark vorbehandelten Patienten folgte unterschiedlichen Mustern.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurden in nur 17 von 71 Fällen (24%) resistente durch vollsensitive Wildtypviren ersetzt. Das Auftreten eines Wildtypstamms korrelierte mit der Pausendauer von über 50 Tagen. Auch andere Studien sahen einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern (Delaugerre et al., 2001; Katlama et al., 2003). Einige Studien zeigten zudem einen noch häufigeren Rückgang zu Wildtyp-Viren (Devereux et al., 1999; Verhofstede et al., 1999; Izopet et al., 2000; Deeks et al., 2001; Delaugerre et al., 2001; Hance et al., 2001; Falkensammer et al., 2002; Kijak et al., 2002; Halfon et al., 2003; Miller, 2000; Lawrence et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde daher gezielt die Evolution der Viren in Therapiepause untersucht.

Insgesamt war ein Rückgang der Mutationen um 56% (438 Mutationen vor Pause/244 in Pause) in der Pause bezüglich des Genotyps vor Pause zu beobachten.

Die Anzahl resistenzassoziierter Mutationen während der Therapiepause sank bei 58 der insgesamt 71 Patienten und 13 Patienten zeigten gar keine Veränderung des vorherrschenden Genotyps.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv sank in dieser Zeit die Anzahl an Protease (PI) Mutationen und nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) assoziierten Mutationen vergleichbar (54% PI Mutationen weniger, 49% NRTI Mutationen weniger) und

weicht somit von den Ergebnissen der Studien von Miller und Deeks ab, die einen stärkeren Rückgang der Proteasemutationen verglichen mit den NRTI Mutationen beobachten konnten (Miller et al., 2000; Deeks et al., 2001). Bei den PI Mutationen war prinzipiell kein Unterschied im Rückgang zwischen primären und sekundären PI Mutationen zu finden. Es gab bestimmte Positionen an denen die Mutationen aber schneller verloren gingen, dies war jedoch unabhängig davon, ob es sich um primäre oder sekundäre PI Mutationen handelte. Dies waren insbesondere die Mutationen L90M und V82A/F/T/S/L. Die V82A/F/TD/L mit einer Prävalenz im Patientenkollektiv von 8 Mutationen vor der Pause, verschwand in der Pause vollständig, bei der L90M wurde noch bei 10 Patienten in der Pause eine Mutation detektiert, bei weiteren 12 Patienten war diese Mutation aber in der Pause verloren gegangen. Die L90M vermittelt eine Resistenz gegenüber allen PIs, ist aber hauptsächlich als Schlüsselresistenzmutation gegenüber den Medikamenten SQV und NFV bekannt (Tupinambas et al., 2005), wohingegen die V82A/F/T/S/L ebenfalls einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber allen PIs, aber vor allem gegen IDV und RTV als Schlüsselmutation angegeben wird. Beide Mutationen sind mit einer starken Reduktion der Replikationsaktivität assoziiert (Ibe et al., 2006), wodurch das schnelle Verschwinden dieser Mutationen in der Pause zu erklären ist, gleiches konnten Hance et al. zeigen (Hance et al., 2001).

Die nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) assoziierten Mutationen sind die Mutationen mit der geringsten Prävalenz im gesamten Patientenkollektiv, was eine statistische Auswertung bezüglich eines schnellen bzw. langsamen Rückgangs einzelner Mutationen in der Pause erschwert. Hier war ebenfalls ein Rückgang um 27% zu beobachten. Ein weiteres Phänomen, welches in der Pause beobachtet wurde, war das Auftreten von „neuen“ NNRTI assoziierten Mutationen. Durch Wegfall des selektiven Medikamentendruckes in einer Therapiepause replizieren solche Viren bevorzugt, die die beste virale Replikationskapazität (Fitness) besitzen (Domingo et al., 2001), daher ist in dieser Zeit normalerweise ein Rückgang von Mutationen zu beobachten. Das Auftreten von neuen Mutationen ist ungewöhnlich und bedarf daher einer genaueren Betrachtung.

In beiden untersuchten Kollektiven traten während oder nach der Pause neue, vorher noch nicht in G₀ bzw. G₁ detektierte Mutationen auf. Neue NNRTI assoziierte Mutationen wurden an den Aminosäurepositionen 103, 108, 179 und 190 der RT in der Pause detektiert. Nach Absetzen der Therapie entstehen lang anhaltende suboptimale Wirkstoffspiegel für NNRTIs im Blut, die nicht mehr ausreichen die Virusreplikation zu unterbinden. So können sich die Viren an den NNRTI vermittelten selektiven Druck anpassen und resistenzassoziierte Mutationen werden provoziert. Bereits im Rahmen der HIV-Prävention bei Schwangeren in Hochprävalenzgebieten wurde beobachtet, dass es oft nach der Einmalgabe von Nevirapin zur häufigen Ausbildung von entsprechender Nevirapinresistenz kommt (Jackson et al.,

2000; Eshleman et al., 2001; Lecossier et al., 2005). Alle in dieser Arbeit untersuchten Patienten, die eine neue NNRTI Mutation entwickelten, waren vorher mit einem NNRTI behandelt worden.

NRTI assoziierte Mutationen hatten im Vergleich zu PI- und NNRTI Mutationen die höchste Prävalenz vor der Therapiepause, weil die Stoffklasse der NRTIs die am längsten eingesetzten Medikamente beinhaltet. Die Anzahl von 223 NRTI Mutationen vor der Pause sank insgesamt um 49,3% auf 113 NRTI Mutationen. Bei genauerer Betrachtung einzelner Mutationen vor und in Pause und deren Rückgangsraten können Rückschlüsse auf die Evolution von Viren gezogen werden. Als Beispiel werden die beiden „*multi drug resistance*“ (MDR) -Mutationen F77L und F116Y aufgeführt, die bei allen Patienten in der Pause bestehen bleiben. Diese Mutationen entstehen im Rahmen der Resistenzentwicklung relativ spät unter lang anhaltendem Medikamentendruck. Vorherrschende, multipel resistente Viren besitzen vermutlich eine ähnlich hohe virale Fitness wie Wildtypviren, da nach der Entwicklung von resistenzassoziierten Mutationen, die zur Unwirksamkeit der Medikamente führten, z.B. die beiden oben genannten Mutationen selektiert werden, um die Replikationsfähigkeit wieder zu steigern. Die These der Fitnessrestitution mit MDR wird von einigen Autoren vertreten und erklärt auch die Beobachtungen in diesem Patientenkollektiv (de la Carriere et al., 1999; Martínez-Picado et al., 1999; Nijhuis et al., 2001; Prado et al., 2005; Villena et al., 2007).

Die höchste Prävalenz vor der Pause wies die M184V auf. Sie ist mit Resistenz gegen 3TC und FTC assoziiert und wurde bei 32 Patienten vor der Pause, aber bei keinem Patienten in Therapiepause detektiert. Dieser Rückgang wurde auch in anderen Analysen, in denen alle Medikamente (Harrigan et al., 2000) bzw. einzelne Medikamentenklassen abgesetzt wurden (Deeks et al., 2005) beobachtet. Erklärt werden kann dieser Rückgang dadurch, dass Stämme die eine M184V tragen eine reduzierte Replikationskapazität zeigen, denn allein das Auftreten dieser Mutation bei der Resistenzentwicklung, resultiert in einem Absinken der Viruslast um 0,5 log-Stufe (Eron et al., 1995). Dementsprechend führt ein Absetzen der Therapie ohne selektiven Druck der Medikamente 3TC oder FTC zum Rückgang dieser Mutation und eine schnellere Replikation ist gewährleistet. Weiterhin ist auch insgesamt die Prävalenz von Thymidinanaloga assoziierten Mutationen T215Y/F, M41L, K70R, D67N und L210W (nach abfallender Prävalenz vor Therapiepause aufgeführt) relativ hoch. Die beobachteten unterschiedlichen Rückgangsraten dieser Mutationen in Therapiepause lassen sich mit einem Resistenzentwicklungsmodell der Thymidinanaloga gut korrelieren (Beerenwinkel et al., 2004). Drei Modelle der Thymidinanaloga-Resistenzentwicklung wurden bisher beschrieben (Larder, and Kemp, 1989; Boucher et al., 1992; Beerenwinkel et al., 2004). Das Modell von Beerenwinkel et al. (Abb.28) zeigt, dass die K70R zu Beginn einer

Resistenzentwicklung auftritt, woraufhin dann drei unterschiedliche Resistenzpfade eingeschlagen werden können.

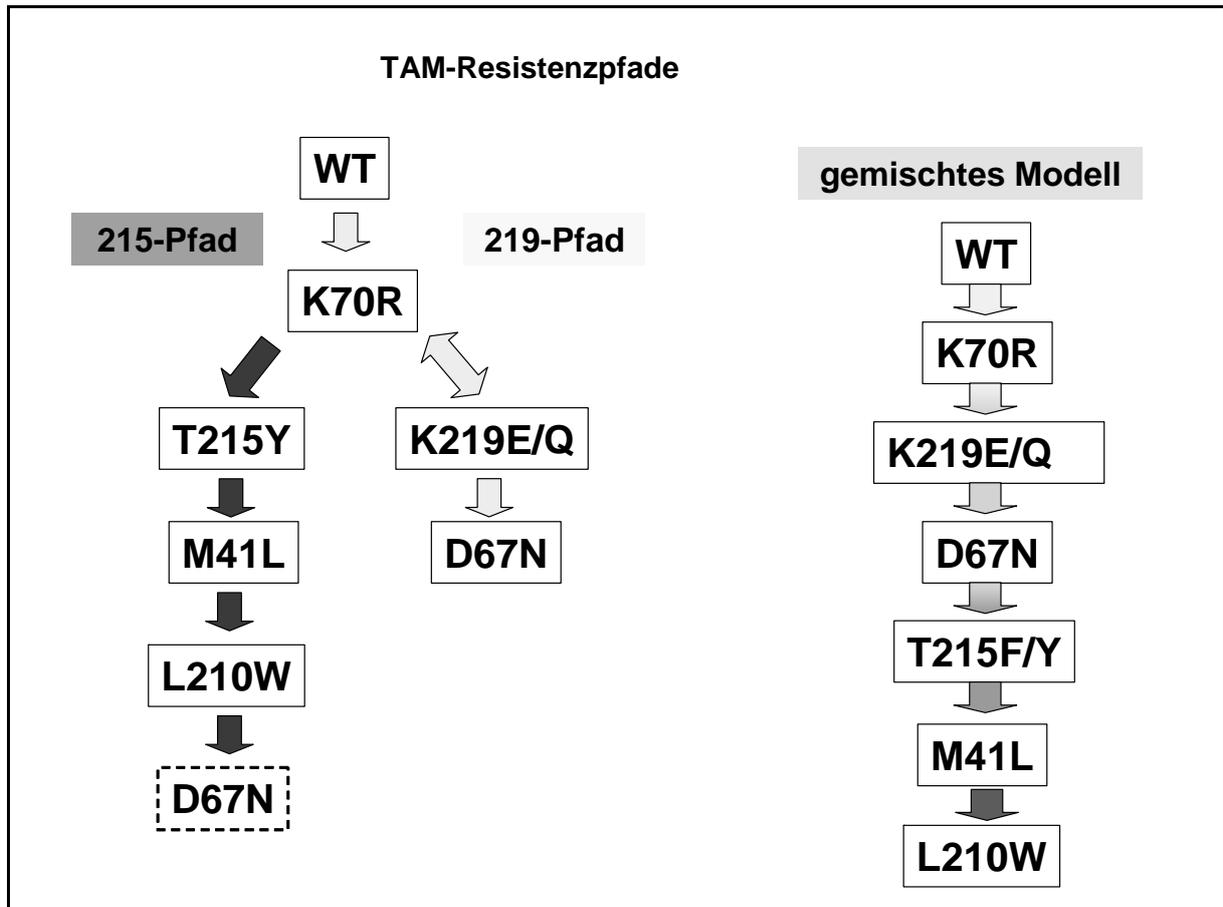


Abb. 28: Schematische Darstellung unterschiedlicher Modelle der Thymidinanaloga Mutation (TAM) Resistenzentwicklung

Darstellung abgewandelt nach Beerenwinkel et al. RECOMP 2004.

Bei dem ersten Resistenzpfad (219-Resistenzpfad) entwickelt sich nach der K70R als nächstes eine Mutation an Position 219, gefolgt von einer D67N. Bei dem zweiten Alternativpfad (215-Resistenzpfad) ist nach der K70R eine T215Y/F zu sehen, gefolgt von einer M41L, L210W und bei manchen Patienten einer D67N. Die dritte Alternative ist ein gemischtes Modell dieser beiden Pfade (Abb. 28). Anhand der detektierten Mutationen wurde dem vorherrschenden Virusstamm jedes Patienten ein bestimmter Resistenzpfad zugeordnet. Bei 15 der 57 Patienten konnte anhand der Resistenztestung vor der Pause keine Aussage über den Resistenzpfad des vorherrschenden Virus gegenüber Thmidinanaloga gemacht werden, da entweder keine TAMs detektiert wurden, oder ausschließlich eine K70R vorlag. Bei 11 Patienten konnten die gefundenen Mutationen dem gemischten Resistenzmodell zugeordnet werden, bei 10 dem 219-Resistenzpfad und bei 21 Patienten zeigten sich Mutationen des 215-Resistenzpfads. Betrachtet man die Rückgangsraten der TAMs in der Pause, dann ist die höchste Rückgangrate die der D67N (57%). Das kann damit erklärt werden, dass sowohl Patienten mit 219-Resistenzpfad, als auch mit 215 Resistenzpfad diese Mutation, als letzte Mutation bei der Resistenzentwicklung

akquirieren, und diese dann auch als erste in der Pause wieder verlieren. Dies gilt unter der Annahme, dass diese Resistenzpfade von den Viren auch in reverser Richtung beschritten werden können. Diese Hypothese wird ebenfalls untermauert durch den Rückgang der folgenden resistenzassoziierten Mutationen. Die L210W geht bei 54% der Patienten zurück, was sich sowohl dem 215-Resistenzpfad als auch dem gemischten Modell zuordnen lässt. Nach dem 215-Pfad folgt auf das Verschwinden der D67N der Rückgang der L210W in der Pause. Im gemischten Modell wird die L210W als letzte Mutation in der Resistenzentwicklung akquiriert und dementsprechend in der Pause zur ersten rückläufigen Mutation. Auch der darauf folgende Rückgang der 215Y/F und der K219E/Q kann mit beiden Resistenzpfaden in reverser Richtung erklärt werden. Abweichend von dem gemischten und dem 215-Resistenzpfad sind die Rückgangsraten der M41L geringer als die der T215Y/F. Die M41L scheint dagegen später zu verschwinden, als dem Modell zur Folge angenommen. Der geringste Rückgang war an Position K70R zu finden, was wieder anhand der beiden Resistenzpfade (215 und 219) nachzuvollziehen ist und zudem noch dadurch zu erklären ist, dass bei drei Patienten an dieser Position in der Therapiepause die K70R neu detektiert wurde. Diese neu detektierte Mutation kann im Gegensatz zu den oben beschriebenen NNRTI Mutationen nicht mit einer langen Halbwertszeit der Medikamente im Blut erklärt werden, da die Medikamente AZT, d4T, ABC und TDF eine deutlich kürzere Halbwertszeit besitzen. Ein Erklärungsansatz könnte der bereits oben beschriebene 215-Resistenzpfad liefern. Bei einigen Patienten, deren Viren sich nach diesem Modell des 215-Resistenzpfades entwickeln, ist das Auftauchen der T215Y/F mit dem gleichzeitigen Verschwinden der K70R assoziiert. Bei den hier beobachteten Patienten wäre in der Pause das Verschwinden der T215Y/F mit dem Auftauchen der K70R verbunden. Bei zwei der drei Patienten ist genau diese Entwicklung nachzuweisen. Bei Patient 3 wird die K70R jedoch in Verbindung mit der T215Y detektiert.

Die Beobachtung von unterschiedlichen Evolutionspfaden von Resistenzmutationen, sowie die Erkenntnis über die Resistenzentwicklung während einer Therapiepause als Ableitung von Resistenzentwicklungspfaden in reverser Richtung, könnten wichtige Informationen über die Gründe und die Vermeidung eines Therapieversagens liefern. Wenn z.B. eine K70R alleine in einer Therapiepause detektiert wurde, kann man aufgrund der in dieser Studie erlangten Erkenntnisse davon ausgehen, dass bei einer geplanten NRTI Therapie auch noch Stämme mit weiteren TAM-Mutationen vorliegen.

Die Untersuchung von virologischen und immunologischen Parametern in der Therapiepause zeigte ebenso wie in zahlreichen anderen Analysen (Devereux et al., 1999; Verhofstede et al., 1999; Izopet et al., 2000; Miller et al., 2000; Deeks et al., 2001; Hance et al., 2001; El-Sadr et al., 2006; Walmsley et al., 2007) in diesem Kollektiv in der Therapiepause einen medianen Anstieg der Viruslast um etwas weniger als eine log-Stufe

(0,8 log Kopien/mL) und ein Abfall der CD4-Zellzahl um ca. 100 Zellen/ μ L (hier 115 Zellen/ μ L, Deeks 128 Zellen/ μ L, Walmsley 80 Zellen/ μ L). Zusätzlich wurde auch die Beobachtung von Deeks (2001) bestätigt, dass ein erhöhter CD4-Zellzahlabfall mit dem Auftreten eines Wildtypvirus signifikant korrelierte, wohingegen seine zweite Beobachtung, dass ein verstärkter Viruslastanstieg bei den Patienten mit Wildtyppopulation in Pause detektiert wurde, in der vorliegenden Analyse nicht zu sehen war.

Es sind bereits Mutationen bekannt, die nicht direkt eine Resistenz gegen bestimmte antiretrovirale Medikamente vermitteln, jedoch aufgrund eines veränderten Basentriplets welches nicht unbedingt einen Aminosäureaustausch zur Folge haben muss, zu einem Herabsetzen der genetischen Barriere bestimmter Medikamente führen kann. Unter entsprechendem Druck kann es dann zu einer schnelleren Ausbildung von resistenzassoziierten Mutationen kommen. Ein Beispiel dafür sind die, in Kollektiv 2 häufig auftretenden Revertanten an Position 215 der Reversen Transkriptase. Wie bereits von (Baraboutis et al., 2007) beschrieben, kann unter der Gabe von Thymidinanaloga bei bestehender T215D/S/N/C die genetische Barriere soweit herabgesetzt sein, dass sich innerhalb weniger Wochen die resistente Form T215Y/F ausgebildet hat. Bei anderen resistenzassoziierten Mutationen (K103N, K219E/Q), wurde überprüft, ob auch hier ungewöhnlicher Codongebrauch zu beobachten ist, der auf eventuelle ehemalige Resistenzen hindeutet oder zu Effekten bezüglich des Absinkens der genetischen Barriere führen kann. Beziehungsweise, ob anhand dieser Basenaustausche erkannt werden konnten. Dies wurde bei Patienten untersucht, die vor der Therapiepause eine K103N oder K219Q/E Mutation aufwiesen, welche durch Wegfall des selektiven Drucks während der Pause verloren ging. Diese Stämme wurden mit Stämmen von therapienaiven Patienten ohne übertragene Resistenz verglichen. Die K103N ist eine NNRTI assoziierte Mutation, deren alleiniges Vorkommen ausreicht, um ein Versagen eines NNRTIs zu bewirken.

Zwei der sieben untersuchten Patienten mit einem Rückgang der K103N Mutation in der Pause, zeigten eine stille Mutation, wohingegen diese nur bei 2 von 20 Therapienaiven detektiert wurde. Obwohl diese stille Mutationen bei ehemals resistenten Stämmen eine höhere Prävalenz zeigten, können sie nicht als Marker genutzt werden, um diese zu erkennen, da die Kodierung auch in Viren unbehandelter Patienten nachgewiesen wurde. Bei K219Q/E zeigten sich keine Unterschiede zwischen ehemals resistenten Viren und Viren, die bisher keinem Medikamentendruck ausgesetzt waren.

Bei 14 Patienten wurden neben den Genotypen vor und in Therapiepause auch noch ein Genotyp nach der Pause unter der neuen Therapie analysiert. Dadurch konnte der Effekt der Pause auf eine neue Therapie aus virologischer Sicht untersucht werden. Im Vergleich zu den Resistenzprofilen vor der Pause war nach wieder Einsetzen einer neuen Therapie bei 8 Patienten ein Virus mit gleich vielen oder mehr Resistenzmutationen nachweisbar. Bei den

anderen sechs Patienten wurde eine sensitivere Viruspopulation, als vor und während der Pause detektiert. Die unterschiedliche Evolution der Resistenzen während und nach der Pause konnte durch keine der vor der Pause bestimmten Parameter vorhergesagt werden. Die Änderungen des Resistenzmusters in und nach der Pause hatten jedoch Konsequenzen auf den Erfolg der neu einsetzenden Therapie. In 8 Patienten, bei denen sich das Resistenzprofil während der Pause nicht veränderte, konnte die folgende Therapie keine nennenswerte Viruslastunterdrückung (Non-Responder) bewirken. Im Gegensatz dazu konnte bei sechs Patienten, in denen weniger resistenzassoziierte Mutationen in und nach der Pause detektiert wurden, eine Reduktion der Viruslast für mindestens 1 Jahr erzielt werden (Responder). Im Gegensatz zu anderen Studien waren weder Länge der Pause, Viruslast und CD4⁺-Zellzahl vor der Pause und CD4⁺ oder Viruslast Änderungen während der Pause prädiktive Parameter für den Erfolg einer neuen Therapie (Izopet et al., 2000; Miller et al., 2000; Deeks et al., 2001; Ruíz et al., 2003; Gianotti et al., 2004). Eine oder keine PI Sekundärmutation oder keine primären PI Mutationen in der Pause korrelierten mit dem Erfolg einer neuen Therapie. Der Genotyp in der Pause war ein guter prädiktiver Parameter für den Therapieerfolg. Als Konsequenz aus dem Verlust von PI-Mutationen während der Pause konnte bei den „Respondern“ und bei zwei „Non-Respondern“ eine gesteigerte Wirksamkeit von Proteaseinhibitoren zwischen vor und in der Pause durch die Interpretationsprogramme geno2pheno und Stanford vorhergesagt werden. Um eine Verknüpfung zwischen Medikamentensensitivität und Erfolg einer neuen Therapie zu erhalten, wurde die Anzahl in der entsprechenden Therapie wirksamen Medikamenten ermittelt. In unserer Studie waren nur die Therapieregime erfolgreich, die mindestens einen wirksamen, geboosteten PI beinhalteten. Nur so konnte eine dauerhafte Viruslastreduktion unter 50 Kopien/mL erreicht werden. Die Notwendigkeit von PIs in einem funktionierenden Therapieregime wurde bereits in anderen Studien berichtet (Deeks et al., 2001; Katlama et al., 2003). Im Vergleich dazu gab es keinerlei Korrelationen zwischen der Anzahl NRTI- oder NNRTI-Mutationen, NRTI- oder NNRTI-Sensitivitätsvorhersagen, oder Wirksamkeit von NRTIs und NNRTIs und dem Erfolg einer neuen Therapie. Einige Autoren sahen das Resistenzprofil vor der Therapiepause als prädiktiv für den Erfolg einer neuen Therapie nach der Pause an (Deeks et al., 2003; Ruíz et al., 2003). Diese Studien postulieren, dass nur die Patienten auf eine Therapie nach der Pause ansprechen, deren Virusstämme schon vor der Pause sensitiv für die Folgetherapie sind. In der vorliegenden Studie gibt es zwar auch eine Korrelation zwischen dem Erfolg der Therapie nach Pause und der Sensitivität bezüglich PIs vor der Pause, aber nicht in jedem Fall war das Profil vor der Pause prädiktiv für den Erfolg der Folgetherapie. Zwei der „Responder“ wiesen bereits vor der Pause Virusstämme auf, die voll sensitiv für alle PIs waren. Bei den 4 weiteren „Respondern“ wurde hingegen eine Resensitivierung erst während der Pause beobachtet.

Im Gegensatz zu diesen einzelnen positiven Ergebnissen wurden in einer groß angelegten Therapieunterbrechungsstudie mit 5472 Patienten von denen 2752 Patienten CD4-Status geleitete Therapiepausen durchführten und einem Vergleichskollektiv mit kontinuierlicher Therapie (SMART) wurde über 16 Monate der klinische Verlauf untersucht. In der SMART-Studie wurde eindrucksvoll der Nachteil von Therapiepausen im klinischen Verlauf gezeigt (El-Sadr et al., 2006). Bei der Studiengruppe mit der diskontinuierlichen Therapie traten im Gegensatz zu den dauertherapierten Patienten erheblich mehr Nebenwirkungen, wie opportunistische Infektionen oder sogar der Tod von Patienten auf. Bei den Patienten, in der hier untersuchten Studie, kam es im Verlauf der Therapiepause zu einem massiven Abfall der CD4⁺-Zellen, was jedoch nach der Pause wieder kompensiert wurde. Bei allen Patienten lagen die CD4⁺-Zellzahlen nach der Pause bei ähnlichen Werten, wie vor der Pause. Demnach hatte die Therapiepause innerhalb dieses Kollektivs keinen erkennbaren negativen Effekt auf die CD4⁺-Zellen der Patienten. Weitere Studien zu gezielten Therapieunterbrechungen werden daher nicht mehr durchgeführt, jedoch unterbrechen weiterhin vereinzelt Patienten ihre Therapie eigenständig.

5.2 Minoritätendetektion

Medikamentenresistenz bei therapie-naiven Patienten könnte einen Einfluss auf die Effizienz der Primärtherapie haben, da resistenzassoziierte Mutationen einer der Hauptgründe für ein Therapieversagen sind (Balotta et al., 2000; Aleman et al., 2002). Den stärksten Effekt haben Resistenzen gegenüber Medikamenten, die nur eine geringe genetische Barriere aufweisen, wie die Substanzklasse der NNRTIs. Bei dieser Substanzklasse kann bereits eine resistenzassoziierte Mutation zu einem Therapieversagen führen.

Der Anteil an NRTI Mutationen, die hier in einem therapie-naiven Patientenkollektiv durch Direktsequenzierung gefunden wurde, liegt mit 10,7% im Rahmen von 8-20% anderer Studien therapie-naiver Patienten (Hecht et al., 1998; Little et al., 2002; Wensing, and Boucher, 2003; Oette et al., 2004; Wensing et al., 2005; Oette et al., 2006; Sagir et al., 2007). Während mit der Standardmethode der Direktsequenzierung nur Populationen mit einem höheren Anteil als 20% detektiert werden können (Schuurman et al., 1999; Schuurman et al., 2002), zeigte sich bei Detektion von Minoritätenpopulationen mit K103N eine Prävalenz von 20%. Die Replikationsfähigkeit des Virus wird durch die K103N nur marginal reduziert, so dass ohne selektiven Druck der Medikamente die Stämme nicht zwangsläufig durch Wildtypstämme ersetzt werden (Nicastrì et al., 2003). Metzner (2005) fand bei 5 von 49 Patienten eine minore K103N Population (10,2%). Diese Prävalenz ist vergleichbar mit dem hier gefundenen Anteil K103N, bei Patienten mit einem HIV-1 Subtyp B (15%). Die höhere Prävalenz dieser Minorität bei Patienten mit einem HIV-1 non-B Subtyp (41%) könnte durch deren Migrationshintergrund begründet sein. Im Rahmen der HIV-

Prävention bei Schwangeren, kommt es in HIV-1 Hochprävalenzgebieten in Afrika oft zur Einmalgabe von Nevirapin. Bedingt durch lange suboptimale Wirkstoffspiegel dieses Medikaments im Blut, kommt es zur häufigen Ausbildung von Nevirapinresistenz (Jackson et al., 2000; Eshleman et al., 2001; Lecossier et al., 2005).

Obwohl 13 von 17 Patienten trotz Minorität mit einem NNRTI-haltigen Regime erfolgreich behandelt wurden, gibt es Anhaltspunkte für ein höheres Risiko des Versagens bei Patienten mit Minorität und NNRTI-Therapie (24% vs.15%). Ein Therapieansprechen trotz minorer resistenter Stämme könnte auf eine voll wirksame Hintergrundtherapie mit zwei antiretroviralen Medikamenten zurückgeführt werden. Anhand der Daten konnte kein Grenzwert bezüglich der Relevanz einer Minorität definiert werden, da sowohl Stämme mit einem geringen Anteil als auch Stämme mit relativ hohem Anteil Minorität ein Therapieversagen zeigten.

In einzelnen Fällen kann der Nachweis von Minoritäten zur Erklärung des Versagens bestimmter Therapien beitragen und gezielt eingesetzt werden, um durch konsequente Wahl eines Therapieregimes ein schnelles Versagen zu vermeiden. Gerade bei therapienaiven Patienten, bei denen schon mittels Direktsequenzierung Mutationen nachgewiesen wurden, die entweder resistenzassoziiert sind oder auf eine herabgesetzte genetische Barriere bezüglich der Resistenzbildung hindeuten, wäre der Einsatz dieser Methode viel versprechend. In dem hier untersuchten Fall wurde bei einem therapienaiven Patienten ein rasches Versagen seiner Primärtherapie festgestellt. Die Therapie wurde mit AZT, 3TC und zusätzlich mit dem Proteaseinhibitor Lopinavir begonnen. Da die genetische Barriere gegenüber diesem PI sehr hoch ist (Walmsley et al., 2002), wurde bei therapienaiven Patienten nur in vereinzelt Fällen ein Therapieversagen mit detektierten Mutationen beschrieben (Conradie et al., 2004; Friend et al., 2004). In beiden Fällen handelte es sich, wie bei dem hier untersuchten Patienten, um einen HIV-1 non-B Subtyp. Conradie et al. postulieren, dass das Vorhandensein von zusätzlichen Polymorphismen in der Protease (M36I und L63P) für das Versagen von LPV verantwortlich war (Conradie et al., 2004). Eine Hypothese für das Therapieversagen mit nachweisbaren Mutationen gegen Lopinavir könnten im beschriebenen Fall übertragene resistenzassoziierte Mutationen sein. Der Genotyp vor der Primärtherapie deutete mit einer T215C (Revertante) auf die Übertragung resistenter Viren hin und damit auf eine schnelle Resistenzentwicklung gegen Thymidinanaloga (z.B. AZT). Mit einem Minoritätenassay konnte bereits vor Beginn der Therapie eine V82A und damit eine LPV-relevante Resistenzmutation nachgewiesen werden. Um ein frühzeitiges Versagen dieser Primärtherapie zu verhindern, kann es aufgrund dieses Befundes sinnvoll sein zusätzlich zur Resistenzanalyse mittels Direktsequenzierung Minderheitenanalysen, für Mutationen durchzuführen, die mit einem schnellen Therapieversagen gegenüber bestimmten Medikamente assoziiert sind.

6 Literaturverzeichnis

- Aleman, S., Soderbarg, K., Visco-Comandini, U., Sitbon, G., and Sonnerborg, A. Drug resistance at low viraemia in HIV-1-infected patients with antiretroviral combination therapy. *AIDS* 2002; 16(7), 1039-44.
- Back, N. K., Nijhuis, M., Keulen, W., Boucher, C. A., Oude Essink, B. O., van Kuilenburg, A. B., van Gennip, A. H., and Berkhout, B. Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *Embo J* 1996; 15(15), 4040-9.
- Balotta, C., Berlusconi, A., Pan, A., Violin, M., Riva, C., Colombo, M. C., Gori, A., Papagno, L., Corvasce, S., Mazzucchelli, R., Facchi, G., Velleca, R., Saporetti, G., Galli, M., Rusconi, S., and Moroni, M. Prevalence of transmitted nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains and pre-existing mutations in pol reverse transcriptase and protease region: outcome after treatment in recently infected individuals. *Antivir Ther* 2000; 5(1), 7-14.
- Baraboutis, I. G., Papastamopoulos, V., Georgiou, O., and Skoutelis, A. T. Revertant multiresistant HIV in chronically infected drug naive patients: when baseline resistance testing is not enough. *Int J STD AIDS* 2007; 18(10), 722-4.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599), 868-71.
- Beerenwinkel, N., Rahnenfuhrer, J., Daumer, M., Hoffmann, D., Kaiser, R., Selbig, J., and Lengauer, T. (2004). *Proc. 8th Ann Int Conf on Res in Comput Biol, San Diego, USA*.
- Boucher, C. A., O'Sullivan, E., Mulder, J. W., Ramautarsing, C., Kellam, P., Darby, G., Lange, J. M., Goudsmit, J., and Larder, B. A. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* 1992; 165(1), 105-10.
- Brodt, H. R., Helm, E. B., Werner, A., Joetten, A., Bergmann, L., Kluver, A., and Stille, W. [Spontaneous course of LAV/HTLV-III infection. Follow-up of persons from AIDS-risk groups]. *Dtsch Med Wochenschr* 1986; 111(31-32), 1175-80.
- Bryant, M., and Ratner, L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(2), 523-7.
- Charpentier, C., Dwyer, D. E., Mammano, F., Lecossier, D., Clavel, F., and Hance, A. J. Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors. *J Virol* 2004; 78(8), 4234-47.
- Chun, T. W., Davey, R. T., Jr., Ostrowski, M., Shawn Justement, J., Engel, D., Mullins, J. I., and Fauci, A. S. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6(7), 757-61.
- Chun, T. W., Engel, D., Mizell, S. B., Hallahan, C. W., Fischette, M., Park, S., Davey, R. T., Jr., Dybul, M., Kovacs, J. A., Metcalf, J. A., Mican, J. M., Berrey, M. M., Corey, L., Lane, H. C., and Fauci, A. S. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected,

- resting CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 1999; 5(6), 651-5.
- Clavel, F., and Hance, A. J. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350(10), 1023-35.
- Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S., Guetard, D., Favier, V., Nina, J., Santos-Ferreira, M. O., Champalimaud, J. L., and Montagnier, L. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* 1987; 316(19), 1180-5.
- Coffin, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267(5197), 483-9.
- Cohn, J. A. Virology, immunology, and natural history of HIV infection. *J Nurse Midwifery* 1989; 34(5), 242-52.
- Conradie, F., Sanne, I., Venter, W., and Eron, J. Failure of lopinavir-ritonavir (Kaletra)-containing regimen in an antiretroviral-naive patient. *Aids* 2004; 18(7), 1084-5.
- Cooper, D. A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T. G., Michelmore, H. M., Brooke, P., and Penny, R. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985; 1(8428), 537-40.
- de la Carriere, L. C., Paulous, S., Clavel, F., and Mammano, F. Effects of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors on reverse transcriptase processing, activity, and drug sensitivity. *J Virol* 1999; 73(4), 3455-9.
- Debouck, C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(2), 153-64.
- Deeks, S. G., Grant, R. M., Wrin, T., Paxinos, E. E., Liegler, T., Hoh, R., Martin, J. N., and Petropoulos, C. J. Persistence of drug-resistant HIV-1 after a structured treatment interruption and its impact on treatment response. *AIDS* 2003; 17(3), 361-70.
- Deeks, S. G., Hoh, R., Neilands, T. B., Liegler, T., Aweeka, F., Petropoulos, C. J., Grant, R. M., and Martin, J. N. Interruption of Treatment with Individual Therapeutic Drug Classes in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 2005; 192(9), 1537-44. Epub 2005 Sep 20.
- Deeks, S. G., Wrin, T., Liegler, T., Hoh, R., Hayden, M., Barbour, J. D., Hellmann, N. S., Petropoulos, C. J., McCune, J. M., Hellerstein, M. K., and Grant, R. M. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001; 344(7), 472-80.
- Delaugerre, C., Valantin, M. A., Mouroux, M., Bonmarchand, M., Carcelain, G., Duvivier, C., Tubiana, R., Simon, A., Bricaire, F., Agut, H., Autran, B., Katlama, C., and Calvez, V. Re-occurrence of HIV-1 drug mutations after treatment re-initiation following interruption in patients with multiple treatment failure. *AIDS* 2001; 15(16), 2189-91.
- Devereux, H. L., Youle, M., Johnson, M. A., and Loveday, C. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999; 13(18), F123-7.
- Domingo, E., Biebricher, C. K., Holland, J. J., and Eigen, M., Eds. (2001). Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Austin, Texas: Landes Bioscience.

- Drake, J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(9), 4171-5.
- Egger, M., Hirschel, B., Francioli, P., Sudre, P., Wirz, M., Flepp, M., Rickenbach, M., Malinverni, R., Vernazza, P., and Battegay, M. Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study. Swiss HIV Cohort Study. *Bmj* 1997; 315(7117), 1194-9.
- El-Sadr, W. M., Lundgren, J. D., Neaton, J. D., Gordin, F., Abrams, D., Arduino, R. C., Babiker, A., Burman, W., Clumeck, N., Cohen, C. J., Cohn, D., Cooper, D., Darbyshire, J., Emery, S., Fatkenheuer, G., Gazzard, B., Grund, B., Hoy, J., Klingman, K., Losso, M., Markowitz, N., Neuhaus, J., Phillips, A., and Rappoport, C. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006; 355(22), 2283-96.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362(6418), 359-62.
- Eron, J. J., Benoit, S. L., Jemsek, J., MacArthur, R. D., Santana, J., Quinn, J. B., Kuritzkes, D. R., Fallon, M. A., and Rubin, M. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party. *N Engl J Med* 1995; 333(25), 1662-9.
- Eshleman, S. H., Mracna, M., Guay, L. A., Deseyve, M., Cunningham, S., Mirochnick, M., Musoke, P., Fleming, T., Glenn Fowler, M., Mofenson, L. M., Mmiro, F., and Jackson, J. B. Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). *AIDS* 2001; 15(15), 1951-7.
- Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., and Stuart, D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 1995; 2(4), 303-8.
- Fackler O, G. M. Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV: Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur. *Biologie in unserer Zeit* 2002; 32, 90-100.
- Falkensammer, B., El Attal, R., Mullauer, B., Sarcletti, M., Parson, W., Dierich, M. P., and Stoiber, H. Loss of zidovudine related mutations in the reverse transcriptase gene of HIV after switching therapy. *Eur J Med Res* 2002; 7(9), 379-86.
- Fauci, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; 384(6609), 529-34.
- Fields, B. K., DM; Howley, PM (1996). "Virology." Third Edition Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Finzi, D., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T. C., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T. C., Chaisson, R. E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J., and Siliciano, R. F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5(5), 512-7.
- Frankel, A. D., and Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67, 1-25.

- Freed, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998; 251(1), 1-15.
- Freed, E. O. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26(1-6), 13-33.
- Friedland, G. H. Report from the 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Further exploring the findings from SMART. *AIDS Clin Care* 2007; 19(10), 83.
- Friend, J., Parkin, N., Liegler, T., Martin, J. N., and Deeks, S. G. Isolated lopinavir resistance after virological rebound of a ritonavir/lopinavir-based regimen. *Aids* 2004; 18(14), 1965-6.
- Frost, S. D., Nijhuis, M., Schuurman, R., Boucher, C. A., and Brown, A. J. Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J Virol* 2000; 74(14), 6262-8.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., and et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224(4648), 500-3.
- Gao, W. Y., Agbaria, R., Driscoll, J. S., and Mitsuya, H. Divergent anti-human immunodeficiency virus activity and anabolic phosphorylation of 2',3'-dideoxynucleoside analogs in resting and activated human cells. *J Biol Chem* 1994; 269(17), 12633-8.
- García, F., Plana, M., Ortíz, G. M., Bonhoeffer, S., Soriano, A., Vidal, C., Cruceta, A., Arnedo, M., Gil, C., Pantaleo, G., Pumarola, T., Gallart, T., Nixon, D. F., Miro, J. M., and Gatell, J. M. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9), F29-40.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M. A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987; 156(1), 171-6.
- Gianotti, N., Soria, A., Galli, L., Castagna, A., Cernuschi, M., Hasson, H., and Lazzarin, A. Predictors of sustained response to therapy resumption after treatment interruption in HIV-infected patients failing antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2004; 72(2), 181-6.
- Goff, S. P. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet* 1992; 26, 527-44.
- Grant, R. M., Hecht, F. M., Warmerdam, M., Liu, L., Liegler, T., Petropoulos, C. J., Hellmann, N. S., Chesney, M., Busch, M. P., and Kahn, J. O. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *Jama* 2002; 288(2), 181-8.
- Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., von Briesen, H., Maniar, J. K., Mahambre, G., Delwart, E. L., Mullins, J. I., and Rubsamen-Waigmann, H. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J Virol* 1994; 68(4), 2161-8.
- Groux, H., Torpier, G., Monte, D., Mouton, Y., Capron, A., and Ameisen, J. C. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175(2), 331-40.

- Gurtler, L. G., Zekeng, L., Tsague, J. M., van Brunn, A., Afane Ze, E., Eberle, J., and Kaptue, L. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* 1996; 11, 195-202.
- Halfon, P., Durant, J., Clevenbergh, P., Carsenti, H., Celis, L., Khiri, H., De Smet, K., De Brauwer, A., Hulstaert, F., and Dellamonica, P. Kinetics of disappearance of resistance mutations and reappearance of wild-type during structured treatment interruptions. *AIDS* 2003; 17(9), 1351-61.
- Hance, A. J., Lemiale, V., Izopet, J., Lecossier, D., Joly, V., Massip, P., Mammano, F., Descamps, D., Brun-Vezinet, F., and Clavel, F. Changes in human immunodeficiency virus type 1 populations after treatment interruption in patients failing antiretroviral therapy. *J Virol* 2001; 75(14), 6410-7.
- Harrigan, P. R., Bloor, S., and Larder, B. A. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *J Virol* 1998; 72(5), 3773-8.
- Harrigan, P. R., Stone, C., Griffin, P., Najera, I., Bloor, S., Kemp, S., Tisdale, M., and Larder, B. Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group. *J Infect Dis* 2000; 181(3), 912-20.
- Hecht, F. M., Grant, R. M., Petropoulos, C. J., Dillon, B., Chesney, M. A., Tian, H., Hellmann, N. S., Bandrapalli, N. I., Digilio, L., Branson, B., and Kahn, J. O. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; 339(5), 307-11.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(15), 7311-5.
- Hessol, N. A., Koblin, B. A., van Griensven, G. J., Bacchetti, P., Liu, J. Y., Stevens, C. E., Coutinho, R. A., Buchbinder, S. P., and Katz, M. H. Progression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection among homosexual men in hepatitis B vaccine trial cohorts in Amsterdam, New York City, and San Francisco, 1978-1991. *Am J Epidemiol* 1994; 139(11), 1077-87.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373(6510), 123-6.
- Hogg, R. S., O'Shaughnessy, M. V., Gataric, N., Yip, B., Craib, K., Schechter, M. T., and Montaner, J. S. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals. *Lancet* 1997; 349(9061), 1294.
- Ibe, S., Fujisaki, S., Morishita, T., and Kaneda, T. Quantitative SNP-detection method for estimating HIV-1 replicative fitness: application to protease inhibitor-resistant viruses. *Microbiol Immunol* 2006; 50(10), 765-72.
- Imamichi, H., Crandall, K. A., Natarajan, V., Jiang, M. K., Dewar, R. L., Berg, S., Gaddam, A., Bosche, M., Metcalf, J. A., Davey, R. T., Jr., and Lane, H. C. Human immunodeficiency virus type 1 quasi species that rebound after discontinuation of

- highly active antiretroviral therapy are similar to the viral quasi species present before initiation of therapy. *J Infect Dis* 2001; 183(1), 36-50.
- Izopet, J., Massip, P., Souyris, C., Sandres, K., Puissant, B., Obadia, M., Pasquier, C., Bonnet, E., Marchou, B., and Puel, J. Shift in HIV resistance genotype after treatment interruption and short-term antiviral effect following a new salvage regimen. *AIDS* 2000; 14(15), 2247-55.
- Jackson, J. B., Becker-Pergola, G., Guay, L. A., Musoke, P., Mracna, M., Fowler, M. G., Mofenson, L. M., Mirochnick, M., Mmiro, F., and Eshleman, S. H. Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission. *AIDS* 2000; 14(11), F111-5.
- Jaworowski, A., and Crowe, S. M. Does HIV cause depletion of CD4+ T cells in vivo by the induction of apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999; 77(1), 90-8.
- Kahn, J. O., and Walker, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339(1), 33-9.
- Karacostas, V., Wolffe, E. J., Nagashima, K., Gonda, M. A., and Moss, B. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* 1993; 193(2), 661-71.
- Katlama, C., Domínguez, S., Duvivier, C., Delaugerre, C., Peytavin, G., Legrand, M., Calvez, V., Gurlain, K., and Costagliola, D. (2003). *10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston (USA)*.
- Kijak, G. H., Simon, V., Balfe, P., Vanderhoeven, J., Pampuro, S. E., Zala, C., Ochoa, C., Cahn, P., Markowitz, M., and Salomon, H. Origin of human immunodeficiency virus type 1 quasiespecies emerging after antiretroviral treatment interruption in patients with therapeutic failure. *J Virol* 2002; 76(14), 7000-9.
- Kilby, J. M., and Eron, J. J. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* 2003; 348(22), 2228-38.
- Kilgore, N. R., Salzwedel, K., Reddick, M., Allaway, G. P., and Wild, C. T. Direct evidence that C-peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry bind to the gp41 N-helical domain in receptor-activated viral envelope. *J Virol* 2003; 77(13), 7669-72.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 1987; 237(4820), 1351-5.
- Larder, B. A., and Kemp, S. D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989; 246(4934), 1155-8.
- Lawrence, J., Mayers, D. L., Hullsiek, K. H., Collins, G., Abrams, D. I., Reisler, R. B., Crane, L. R., Schmetter, B. S., Dionne, T. J., Saldanha, J. M., Jones, M. C., and Baxter, J. D. Structured treatment interruption in patients with multidrug-resistant human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 2003; 349(9), 837-46.
- Lecossier, D., Shulman, N. S., Morand-Joubert, L., Shafer, R. W., Joly, V., Zolopa, A. R., Clavel, F., and Hance, A. J. Detection of minority populations of HIV-1 expressing the

- K103N resistance mutation in patients failing nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38(1), 37-42.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225(4664), 840-2.
- Li, T. S., Tubiana, R., Katlama, C., Calvez, V., Ait Mohand, H., and Autran, B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998; 351(9117), 1682-6.
- Little, S. J., Holte, S., Routy, J. P., and al., e. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347, 385-94.
- Louwagie, J., McCutchan, F. E., Peeters, M., Brennan, T. P., Sanders-Buell, E., Eddy, G. A., van der Groen, G., Fransen, K., Gershby-Damet, G. M., Deleys, R., and et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *Aids* 1993; 7(6), 769-80.
- Maree, A. F., Keulen, W., Boucher, C. A., and De Boer, R. J. Estimating relative fitness in viral competition experiments. *J Virol* 2000; 74(23), 11067-72.
- Martínez-Picado, J., Savara, A. V., Sutton, L., and D'Aquila, R. T. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1999; 73(5), 3744-52.
- Metzner, K. J., Bonhoeffer, S., Fischer, M., Karanicolas, R., Allers, K., Joos, B., Weber, R., Hirschel, B., Kostrikis, L. G., and Gunthard, H. F. Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 2003; 188(10), 1433-43. Epub 2003 Nov 3.
- Metzner, K. J., Rauch, P., Walter, H., Boesecke, C., Zollner, B., Jessen, H., Schewe, K., Fenske, S., Gellermann, H., and Stellbrink, H. J. Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS* 2005; 19(16), 1819-1825.
- Miller, V., Rottmann, C., Hertogs, K., Larder, B. A., Phillips, A. N., Cozzi-Lepri, A., M., S., Gute, P., and Staszewski, S. Mega-HAART, resistance and drug holidays. *Antiviral Ther* 1999; 5(Suppl. 3), 27-8.
- Miller, V., Sabin, C., Hertogs, K., Bloor, S., Martinez-Picado, J., D'Aquila, R., Larder, B., Lutz, T., Gute, P., Weidmann, E., Rabenau, H., Phillips, A., and Staszewski, S. Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *AIDS* 2000; 14(18), 2857-67.
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W., and Broder, S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(20), 7096-100.
- Modrow S, F. D., Truyen U (2003). "Molekulare Virologie." Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A., and Capon, D. J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 1985; 313(6002), 450-8.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155, 335-50.
- Nicastri, E., Sarmati, L., d'Ettorre, G., Palmisano, L., Parisi, S. G., Uccella, I., Rianda, A., Concia, E., Vullo, V., Vella, S., and Andreoni, M. Replication capacity, biological phenotype, and drug resistance of HIV strains isolated from patients failing antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2003; 69(1), 1-6.
- Nijhuis, M., Deeks, S., and Boucher, C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14(1), 23-8.
- Norrgren, H., Marquina, S., Leitner, T., Aaby, P., Melbye, M., Poulsen, A. G., Larsen, O., Dias, F., Escanilla, D., Andersson, S., Albert, J., and Naucler, A. HIV-2 genetic variation and DNA load in asymptomatic carriers and AIDS cases in Guinea-Bissau. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16(1), 31-8.
- Oette, M., Kaiser, R., Daumer, M., Akbari, D., Fatkenheuer, G., Rockstroh, J. K., Stechel, J., Rieke, A., Mauss, S., Schmaloeer, D., Gobels, K., Vogt, C., Wettstein, M., and Haussinger, D. Primary drug-resistance in HIV-positive patients on initiation of first-line antiretroviral therapy in Germany. *Eur J Med Res* 2004; 9(5), 273-8.
- Oette, M., Kaiser, R., Daumer, M., Petch, R., Fatkenheuer, G., Carls, H., Rockstroh, J. K., Schmaloeer, D., Stechel, J., Feldt, T., Pfister, H., and Haussinger, D. Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(5), 573-81.
- Paillart, J. C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(11), 5572-7.
- Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., and Holmberg, S. D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338(13), 853-60.
- Palmer, S., Shafer, R. W., and Merigan, T. C. Highly drug-resistant HIV-1 clinical isolates are cross-resistant to many antiretroviral compounds in current clinical development. *Aids* 1999; 13(6), 661-7.
- Parkin, N. T., Chappey, C., and Petropoulos, C. J. Improving lopinavir genotype algorithm through phenotype correlations: novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *Aids* 2003; 17(7), 955-61.
- Peliska, J. A., and Benkovic, S. J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1992; 258(5085), 1112-8.
- Peng, C., Ho, B. K., Chang, T. W., and Chang, N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol* 1989; 63(6), 2550-6.

- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271(5255), 1582-6.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224(4648), 497-500.
- Prado, J. G., Parkin, N. T., Clotet, B., Ruiz, L., and Martinez-Picado, J. HIV type 1 fitness evolution in antiretroviral-experienced patients with sustained CD4+ T cell counts but persistent virologic failure. *Clin Infect Dis* 2005; 41(5), 729-37.
- Richman, D., Bozzette, S., Morton, S., Chien, S., Wrin, T., Dawson, K., and Hellmann, N. (2001). *41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2001), Chicago, USA.*
- Rosenberg, E. S., Altfeld, M., Poon, S. H., Phillips, M. N., Wilkes, B. M., Eldridge, R. L., Robbins, G. K., D'Aquila, R. T., Goulder, P. J., and Walker, B. D. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407(6803), 523-6.
- Ruiz, L., Ribera, E., Bonjoch, A., Romeu, J., Martínez-Picado, J., Paredes, R., Díaz, M., Marfil, S., Negredo, E., García-Prado, J., Tural, C., Sirera, G., and Clotet, B. Role of structured treatment interruption before a 5-drug salvage antiretroviral regimen: the Retrogene Study. *J Infect Dis* 2003; 188(7), 977-85.
- Sagir, A., Oette, M., Kaiser, R., Daumer, M., Fatkenheuer, G., Rockstroh, J. K., Knechten, H., Schmutz, G., Hower, M., Emmelkamp, J., Pfister, H., and Haussinger, D. Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(4), 843-848.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992; 24, 104-8.
- Schuurman, R., Brambilla, D., de Groot, T., Huang, D., Land, S., Bremer, J., Benders, I., and Boucher, C. A. Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations: results from the ENVA-2 genotyping proficiency program. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(4), 243-8.
- Schuurman, R., Demeter, L., Reichelderfer, P., Tijnagel, J., de Groot, T., and Boucher, C. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7), 2291-6.
- Simon, V., Padte, N., Murray, D., Vanderhoeven, J., Wrin, T., Parkin, N., Di Mascio, M., and Markowitz, M. Infectivity and replication capacity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants isolated during primary infection. *J Virol* 2003; 77(14), 7736-45.
- Stebbing, J., and Moyle, G. The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* 2003; 5(4), 205-13.
- Telesnitsky A, G. S. (1997). "Reverse transcription and the generation of retroviral DNA." *Retroviruses* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Tupinambas, U., Aleixo, A., and Greco, D. HIV-1 genotypes related to failure of nelfinavir as the first protease inhibitor treatment. *Braz J Infect Dis* 2005; 9(4), 324-9.

- Verhofstede, C., Wanzele, F. V., Van Der Gucht, B., De Cabooter, N., and Plum, J. Interruption of reverse transcriptase inhibitors or a switch from reverse transcriptase to protease inhibitors resulted in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitor-sensitive genotype. *AIDS* 1999; 13(18), 2541-6.
- Villena, C., Prado, J. G., Puertas, M. C., Martinez, M. A., Clotet, B., Ruiz, L., Parkin, N. T., Menendez-Arias, L., and Martinez-Picado, J. Relative fitness and replication capacity of a multinucleoside analogue-resistant clinical human immunodeficiency virus type 1 isolate with a deletion of codon 69 in the reverse transcriptase coding region. *J Virol* 2007; 81(9), 4713-21.
- Violin, M., Cozzi-Lepri, A., Velleca, R., Vincenti, A., D'Elia, S., Chiodo, F., Ghinelli, F., Bertoli, A., d'Arminio Monforte, A., Perno, C. F., Moroni, M., and Balotta, C. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18(2), 227-35.
- von der Helm, K. Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol Chem* 1996; 377(12), 765-74.
- Wainberg, M. A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* 2004; 18 Suppl 3, S63-8.
- Walmsley, S., Bernstein, B., King, M., Arribas, J., Beall, G., Ruane, P., Johnson, M., Johnson, D., Lalonde, R., Japour, A., Brun, S., and Sun, E. Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med* 2002; 346(26), 2039-46.
- Walmsley, S. L., Thorne, A., Loutfy, M. R., LaPierre, N., MacLeod, J., Harrigan, R., Trottier, B., Conway, B., Hay, J. R., Singer, J., and Zarowny, D. A prospective randomized controlled trial of structured treatment interruption in HIV-infected patients failing highly active antiretroviral therapy (Canadian HIV Trials Network Study 164). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45(4), 418-25.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373(6510), 117-22.
- Wensing, A. M., and Boucher, C. A. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 2003; 5(3), 140-55.
- Wensing, A. M., van de Vijver, D. A., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M. L., Costagliola, D., De Luca, A., Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, A., Hemmer, R., Hoepelman, A., Horban, A., Korn, K., Kucherer, C., Leitner, T., Loveday, C., MacRae, E., Maljkovic, I., de Mendoza, C., Meyer, L., Nielsen, C., Op de Coul, E. L., Ormaasen, V., Paraskevis, D., Perrin, L., Puchhammer-Stockl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J. C., Schneider, F., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, G., Stanojevic, M., Vandamme, A. M., Van Laethem, K., Violin, M., Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, M., and Boucher, C. A. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192(6), 958-66.
- Whitcomb, J. M., and Hughes, S. H. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8, 275-306.

- Wild, C., Greenwell, T., Shugars, D., Rimsky-Clarke, L., and Matthews, T. The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(3), 323-5.
- Wilson, J. W. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. *AIDS Read* 2003; 13(1), 25-30, 35-8.
- Zala, C., Salomón, H., Ochoa, C., Kijak, G., Gun, A., Bouzas, M., Montaner, J., and Cahn, P. (2001). *1st IAS Conference on HIV Pathogenesis, Buenos Aires (Argentina)*.

7 Abkürzungen

3TC	Lamivudin (NRTI)
aa oder AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir (NRTI)
abs.	absolut
AIDS	„ <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> “, Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
APV	Amprenavir (PI)
AZT	Azidotymidin, Zidovudin (NRTI)
bp	Basenpaar
CA	Kapsidprotein
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Centers for Disease Control (Atlanta, USA)
cDNA	komplementäre DNA
CT-Wert	„ <i>Threshold Cycle</i> “, Schwellenwert-Zyklus
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
CRF01-CRF16	„ <i>circulating recombinant forms</i> “ 01-16
d4T	Stavudin (NRTI)
ddC	Zalcitabin (NRTI)
ddI	Didanosin (NRTI)
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphat
DLV	Delaviridin (NNRTI)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFV	Efavirenz (NNRTI)
EI	Eintrittsinhibitor
env	<i>envelope</i> Gen des HIV-Genoms
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FI	Fusionsinhibitoren
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
G	Genotyp
gag	Gen der Gruppenspezifische Antigene

Abkürzungsverzeichnis

gp	Glykoprotein
HAART	„ <i>highly active antiretroviral therapy</i> “ Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HIV-2	Humanes Immundefizienz Virus Typ 2
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HXB2	HIV-1 Subtyp B Wildtyppräferenzsequenz
IASUSA	<i>Internationalen Aids Society USA</i>
IDV	Indinavir (PI)
IN	Integrase
INI	Integraseinhibitor
ITP	in Therapiepause
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LC	Light Cyclor
LNAs	<i>locked nucleic acids</i>
LPV	Lopinavir (PI)
LTR	„ <i>long terminal repeat</i> “
MA	Matrixprotein
MDR	„ <i>multi drug resistance</i> “
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
mRNA	„ <i>messenger</i> “-RNA
NaAc	Natriumacetat
NC	Nukleoprotein
Nef	„ <i>Negative Regulatory Factor</i> “
NFV	Nelfinavir (PI)
NtRTI	nukleotidische Reverse Transkriptaseinhibitoren
NNRTI	nicht nukleosidischer Reverse Transkriptaseinhibitor
NRTI	nukleosidischer Reverse Transkriptaseinhibitor
NSI	nicht-Syncytium-induzierend
nt	Nukleotid
ORF	„ <i>open reading frame</i> “, offenes Leseraster
P	Protein PBMC
PBMC	periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Proteaseinhibitor
PIK	Präintegrationskomplex

Abkürzungsverzeichnis

PR	Protease
pol	Polymerase-Gen des HIV-Genoms
POP-6	Performance Optimized Polymer 6'
Rev	„ <i>Regulator of Virion protein expression</i> ”
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
RT	Reverse Transkriptase
RTI	Reverse Transkriptase Inhibitoren
RTV	Ritonavir
SI	Syncytium-induzierend
SMART	Therapiepausstudie
SQV	Saquinavir (PI)
T	Vortherapien
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
tat	„ <i>trans-activator of transcription</i> ”
TE	Tris-EDTA-Lösung
TI	<i>Treatment interruption</i>
TP	Therapiepause
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UNG	Uracil N-Glycosylase
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vif	<i>viral infectivity factor</i>
VL	Viruslast
vpr	<i>viral protein rapid</i>
vpu	<i>viral protein unique</i>
vs.	<i>Versus</i>
VTP	vor Therapiepause
WT	Virus mit Wildtypsequenz

IUB-Code

A: Adenin	T: Thymin
C: Cytosin	U: Uracil

8 Zusammenfassung

Die hohe Mutationsrate von HIV führt zu einer gesteigerten Populationsdynamik und zur gleichzeitigen Existenz mehrerer Viruspopulationen (Quasispezies) bei einem Patienten.

In Therapiepausen verändern sich die vorherrschenden Viruspopulationen, aufgrund des Wegfalls des selektiven Medikamentendrucks. HIV-Stämme, die unter einer Therapie resistenzassoziierte Mutationen entwickelt haben, weisen häufig eine reduzierte Replikationsfähigkeit auf und werden während einer Therapiepause durch Stämme mit einer besseren viralen Fitness verdrängt. In der vorliegenden Arbeit wurden in der Therapiepause insgesamt weniger Mutationen als vor der Pause detektiert. Die Detektion eines HIV-Wildtypstamms korrelierte signifikant mit einer Dauer der Pause ≥ 51 Tage. Mutationen, die stark die virale Fitness beeinträchtigen, wie M184V in der Reversen Transkriptase (RT), konnten trotz hoher Prävalenz vor der Pause, in der Pause nicht mehr nachgewiesen werden. Andererseits traten in der Pause aber auch Mutationen auf, die vorher noch nicht detektiert werden konnten. Dies waren vorwiegend NNRTI assoziierte Mutationen, deren Selektion aufgrund der langen Halbwertszeit von NNRTI im Blut und daraus resultierender suboptimaler Wirkstoffspiegel begünstigt ist. Die Selektion der NRTI Mutation K70R in der RT, die bei drei Patienten erst in der Pause detektiert wurde, kann über einen NRTI-Resistenz-Mutationspfad erklärt werden. K70R ist eine frühe Mutation, die nach Selektion weiterer Resistenzmutationen verloren gehen kann. Bei Verlust dieser zusätzlichen Mutationen in der Therapiepause setzt sich anscheinend wieder eine frühe Variante des Resistenzpfads durch. Eine signifikante Korrelation von ≤ 1 sekundären PI Mutation oder keiner primären PI Mutation und dem Erfolg der Therapie nach der Pause empfahl die Anzahl an PI Mutationen in der Pause als prädiktiven Parameter für den Erfolg der Therapie nach der Pause.

Der Vergleich von Wildtypvarianten, die in der Pause entstanden waren mit Wildtypstämmen von therapie-naiven Patienten an den Codons der Aminosäurepositionen 103 bzw. 219 der RT gab keinen Hinweis, dass stille Mutationen im Genom des Virus als Spuren einer ehemaligen Resistenz hinterlassen werden.

In einem Kollektiv von 159 therapie-naiven Patienten wurde die Prävalenz von übertragenen, resistenten Virusstämmen untersucht. Durch Direktsequenzierung wurden bei 10,7% übertragene NRTI und bei 3,8% übertragene NNRTI Resistenzen gefunden. Um die Prävalenz von Virusstämmen mit einer NNRTI assoziierten K103N zu einem geringeren Anteil als 20% an der Gesamtpopulation zu untersuchen, wurde ein Minderheitenassay entwickelt, der eine Sensitivität bis zu 0,2% besaß. Diese Mutation wurde ausgewählt, weil sie alleine ausreichend ist, um ein Medikamentenversagen aller NNRTIs zu verursachen. Die K103N war mit dieser Minderheitenanalyse bei 20% der Patienten detektierbar. Klassifiziert nach HIV-1 Subtyp zeigte sich ein signifikant höherer Anteil K103N Minderheiten (40,6%) bei den non-B Subtypen, im Vergleich zu 15% bei den Patienten mit einem HIV-1 Subtyp B. Untersuchungen zur klinischen Relevanz dieser vor Therapiebeginn detektierten minoren NNRTI-resistenten Stämme zeigen, dass tendenziell (aber nicht signifikant) mehr Patienten unter einem NNRTI-Regime versagten, wenn sie vor Therapiestart eine Minderheit aufwiesen. Dabei konnte das Therapieversagen jedoch nicht auf den prozentualen Anteil minorer NNRTI resistenter Stämme innerhalb der Gesamtviruspopulation zurückgeführt werden.

9 Abstract

As a consequence of the high mutation rate of HIV, different viral populations can coexist in one patient. The lack of selective pressure of drugs caused by a treatment interruption (TI) frequently leads to a shift in the circulating major virus population to a more sensitive strain. HIV-strains with resistance associated mutations, developed under antiretroviral therapy, had frequently lower replication capacities and were displaced by viral populations with a higher fitness during TI.

In this work, cessation of treatment leads to a significant reduction in the number of resistance associated mutations. The detection of a wildtype virus in TI correlates significantly with duration of interruption ≥ 51 days. Mutations with a negative strong effect on the viral fitness, e.g. the M184V highly prevalent before interruption, disappeared completely during TI. The emergence of newly detected resistant associated mutations, which were not visible before TI, needs to be addressed. This risk is especially high for NNRTIs due to the long half-life of these drugs, which leads to suboptimal plasma concentration long after their withdrawal. The selection of the NRTI associated K70R reverse transcriptase (RT) mutation in three patients can be explained by a previously described pathway of a thymidine analogue mutation resistance development. K70R is one early mutation visible during resistance development in this pathway and can fade after the selection of other resistance mutations. During TI, after losing these additional mutations, an early variant of this resistance pathway seems to dominate. Moreover, a number of ≤ 1 secondary PI resistance mutations or the absence of primary mutations during TI statistically correlated with success of a new treatment. Therefore, the genotype during TI was an adequate predictor of therapy success.

Comparing TI related- and therapy naive wt variants of RT with respect to codon usage regarding aa 103 and 219 showed no silent mutations as a predictor for previously detected resistance.

Furthermore, the prevalence of transmitted resistance in a collective of 159 therapy naive patients was investigated. Using bulk sequencing, 10.7% NRTI and 3.8% NNRTI resistance associated mutations were detected. In order to verify the prevalence of NNRTI associated K103N RT mutation with an occurrence lower than 20% of the virus population, a minority assay with a sensitivity of $\geq 0.2\%$ was developed. This mutation was chosen because K103N alone is already sufficient for NNRTI drug failure. In 20% of the patients a minor variant harbouring a K103N was found. Furthermore, a significant higher amount of minorities were detected in patients with a non-B subtype (40.6%) than with a HIV-1 subtype B (15%). Studies showed that the clinical relevance of this mutation, which was detected before treatment, showed a tendency (not significant) of more patients failing NNRTI therapy with than without minority. Clinical studies demonstrated, patients carrying minorities before therapy show the (not significant) tendency not to respond to NNRTI therapy. However, there was no threshold for K103N and subsequent virological failure.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die auf das Gelingen dieser Arbeit positiven Einfluss genommen haben.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Rolf Kaiser. Ihm danke ich für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die interessanten fachlichen Diskussionen, seine hilfreichen Ratschläge und vor allem seine Menschlichkeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Pfister bedanke ich mich für die Betreuung dieser Promotion und die sehr hilfreichen und anregenden Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. S. Roth und Frau Prof. Dr. K. Schnetz danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Laborkollegen bedanken, für die schöne gemeinsame Zeit, eine unvergessliche Arbeitsatmosphäre und die moralische und vor allem freundschaftliche Unterstützung in jeder Situation: Allen voran Martin Däumer, der mir auch nach Verlassen des Instituts immer mit Rat und Tat zur Seite stand, Dörte Hammerschmidt, Saleta Sierra Aragon, Ibrahim Boussaad, Elena Knops, Maria Fraune, Jens Verheyen, Claudia Müller, Nadine Sichtig, Eva Heger, Steffi Rech, Monika Timmen-Wego, Susanna Trapp und Eugen Schülter.

Ulla Krüppel, Jenny Pahne, Inke & Sönke Weißenborn, Andreas Müller-Schiffmann, David Müller, Martin Hufbauer, Susanne Schmidt, Sabine Awerkiew, Nadine Schröer, Gian Paolo Marcuzzi danke ich für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung und für die fachübergreifenden Aktivitäten.

Bei Prof. Dr. Daniel Hoffmann und Prof. Dr. Thomas Lengauer bedanke ich mich für Unterstützung in bioinformatischen Fragen.

Herrn Prof. Dr. J. K. Rockstroh, PD Dr. Mark Oette, Prof. Dr. Gerd Fätkenheuer, der RESINA Study-group und deren Teams danke ich für die freundliche Unterstützung bei Fragen, Bereitstellung der Blutproben von Patienten in Therapiepause und therapienaiven Patienten und den entsprechenden Daten.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie bedanke ich mich für die herzliche Atmosphäre, die stets vorhandene Hilfsbereitschaft und viele lustige Stunden.

Den fleißigen Korrekturlesern & -leserinnen, Ulla Krüppel, Jenny Pahne, Andreas Müller-Schiffmann und Nadine Sichtig danke ich für die guten Anregungen und die Diskussionsbereitschaft, ihren Einsatz und vor allem ihre Freundschaft.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder und meinen Freunden. Sie haben mich immer liebevoll und moralisch unterstützt, mir auch in nicht so einfachen Zeiten immer Mut gemacht, aber auch für die erholsamen und lustigen Momente gesorgt. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Union und dem Bundesministerium für Gesundheit finanziert.

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Melanie Balduin, Niko Beerenwinkel, Saleta Sierra, Martin Däumer, Jürgen Rockstroh, Mark Oette, Gerd Fätkenheuer, Bernd Kupfer, Daniel Hoffmann, Joachim Selbig, Herbert Pfister, and Rolf Kaiser

Evolution of HIV resistance during treatment interruption in experienced patients and after restarting a new therapy

J Clin Virol **34** (4): 277-287, 2005

2. Jens Verheyen, Elena Litau, Tobias Sing, Martin Däumer, Melanie Balduin, Mark Oette, Gerd Fätkenheuer, Jürgen K. Rockstroh, Ulrike Schuldenzucker, Daniel Hoffmann, Herbert Pfister, and Rolf Kaiser

Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients

Antiviral Therapy **11** (7): 879-887, 2006

3. Melanie Balduin, Mark Oette, Martin P Däumer, Daniel Hoffmann, Herbert J Pfister and Rolf Kaiser on behalf of the RESINA Study Group

Prevalence of minor variants of HIV strains at reverse transcriptase position 103 in therapy-naïve patients and their impact on the virological failure

eingereicht

Köln, 22.04.2008

Melanie Balduin

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Melanie Balduin
Adresse: Marathonstr. 52, 53881 Euskirchen
Geburtstag: 04. April 1975
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1981-06/1985: Gemeinschaftsgrundschule Wißkirchen
08/1985-06/1994: Städtisches Gymnasium Marienschule Euskirchen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1994 Rheinische Friedrich Wilhelm Universität Bonn
05/2002 Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Zellbiologie
Physik
05/2002 Abschluss: Diplom

Seit 12/2002 Promotion am Institut für Virologie
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

13 Anhang

PROTEASE INHIBITOREN (PIs)											
	L 10	K 20	L 24	D 30	V 32	L 33	M 36	M 46	I 47	G 48	I 50
Saquinavir	I									V	
Indinavir	I,R,V	M,R	I		I		I	I,L			
Nelfinavir				N			I	I,L			
Ritonavir	I	R			I	F	I	I			
Amprenavir	F,I,R,V				I			I,L	V		V
Lopinavir/r	F	M,R	I		I	F		I,L	V		V
Atazanavir					I			I			L
Tipranavir	V	R				F	I	L			

	F 53	I 54	L 63	A 71	G 73	V 77	V 82	I 84	N 88	L 90
Saquinavir		L,V	P	V	S	I	A	V		M
Indinavir		L,V	P	T,V	A,S	I	A,F,T	V		M
Nelfinavir		L,V	P	V		I	A,F,S,T	V	D	M
Ritonavir		L,V	P	V		I	A,F,S,T	V		M
Amprenavir		L,M,V			S			V		M
Lopinavir/r	L	L,V	P	V	S		A,F,S,T	V		M
Atazanavir		L		V			A	V	S	M
Tipranavir		V								

 Primäre Mutationen Sekundäre Mutationen

REVERSE TRANSKRIPTASE INHIBITOR (NRTI, NNRTI)														
NRTIs														
	M 41	E 44	K 65	D 67	T 69	K 70	L 74	V 75	Y 115	V 118	M 184	L 210	T 215	K 219
Zidovudin	L	D		N		R				I		W	F,Y	E,Q
Stavudin	L	D		N		R		A,M,S,T		I		W	F,Y	E,Q
Lamivudin		D								I	I,V			
Didanosin			R	N	D,N	R	V							E,Q
Zalcitabin			R		D			M			V		C	
Abacavir	L		R	N		R	V		F		V	W	F,Y	E,Q
Tenofovir*	L		R	N	D,N,S	R						W	F,Y	E,Q

 Multi-NRTI Resistenz, NAMs *nukleotidischer RT Inhibitor (NtRTI)

Multi NRTI-Resistenz gegen alle NRTIs						Verstärkung von AZT/3TC Resistenz			
A 62	T 69	V 75	F 77	F 116	Q 151	H 208	R 211	L 214	G 333
V	T_S/TXX ¹	I	L	Y	M	Y	K	F	E

 ¹Insertion SS, SA, SG

NNRTIs													
	A 98	L 100	K 101	K 103	V 106	V 108	V 179	Y 181	Y 188	G 190	P 225	M 230	P 236
Nevirapin	G	I		N	A	I		C,I	C,H,L	A,S			
Delaviridin				N,T				C	H			L	
Efavirenz		I	E	N		I	D	(C,I)	L	A,S			

Tab.13: Resistenzassoziierte Mutationen gegen Reverse Transkriptase und Protease Inhibitoren

Quellen: International AIDS Society-USA (http://www.iasusa.org/resistance_mutations/index.html)

- Los Alamos Resistance database. Parikh U, Calef C, Larder B, Schinazi R, Mellors JW. Mutations in Retroviral Genes Associated with Drug Resistance.

Stoffklasse	Generischer Name	Abkürzung	Hersteller
NRTI	Adefovir	ADV	Gileas Science
NRTI	Zidovudin	AZT, ZDV	GlaxoSmithKline
NRTI	Lamivudin	3TC	GlaxoSmithKline
NRTI	Abacavir	ABC	GlaxoSmithKline
NRTI	Didanosin	ddl	BMS
NRTI	Stavudin	d4T	BMS
NRTI	Tenofovir	TDF	Gileas Science
NRTI	Emtricitabin	FTC	Gileas Science
NRTI	Zalcitabin	ddC	Hoffmann La-Roche
NNRTI	Delaviridin	DLV	Pfizer
NNRTI	Efavirenz	EFV	BMS
NNRTI	Nevirapin	NVP	Boehringer Ingelheim
PI	Amprenavir	APV	GlaxoSmithKline
PI	Indinavir	IDV	Merck
PI	Saquinavir	SQV	Hoffmann La-Roche
PI	Lopinavir	LPV/r	ABBOTT
PI	Ritonavir	RTV	ABBOTT
PI	Nelfinavir	NFV	Pfizer
PI	Fosamprenavir	FPV	GlaxoSmithKline
EI	Emfurvitide	ENF/T20	Hoffmann La-Roche
PI	Tipranavir	TPV	Boehringer Ingelheim
PI	Atazanavir	ATV	BMS
EI	Maraviroc	MRV	Pfizer
INI	Raltekravir	RAL	MSD

Tab.14: Medikamentenliste der zur Zeit genehmigten antiretroviralen Medikamente (Stand 2008)