

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Robert Koch-Institut Berlin
FG18 – HIV und andere Retroviren



seit 1558

**Genotypische Bestimmung des HIV-1 Ko-Rezeptorgebrauchs bei HIV-
Neudiagnosen zur Unterscheidung von kürzlich erworbenen und chronischen
Infektionen**

Masterarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Master of Science Biochemistry

vorgelegt von

Madlen Peisker

aus Jena

Jena, September 2016

Gutachter

Prof. Ilse Jacobsen

Prof. Norbert Bannert

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Theoretische Grundlagen.....	1
1.1 Ursprung und Klassifikation des Humanen Immundefizienz Virus (HIV)	1
1.2 Epidemiologie	1
1.3 Studien zum Monitoring der HIV-Epidemie am Robert Koch-Institut	2
1.4 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	3
1.5 Aufbau und Struktur	5
1.6 Genomaufbau	5
1.7 Replikationszyklus	7
1.7.1 Die Hüllproteine von HIV	8
1.7.2 Der molekulare Mechanismus des Viruseintritts	11
1.8 Der Ko-Rezeptorgebrauch des HIV-1	12
1.8.1 Wirtstropismus.....	12
1.8.2 Bestimmung des Ko-Rezeptorgebrauchs.....	13
1.8.3 Vorhersage-Methoden zur genotypischen Bestimmung des Ko- Rezeptorgebrauches	15
1.9 Antiretrovirale Therapie.....	16
2 Zielstellung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Proben.....	20
3.1.2 HIV-1 Subtyp-Referenzpanel (Virusisolate).....	20
3.1.3 Patientenproben	20
3.1.4 Reagenzien	21
3.1.5 Enzyme.....	21
3.1.6 Primer	21
3.1.7 Kommerzielle Kits.....	23
3.1.8 Marker	23
3.1.9 Geräte.....	23

3.1.10	Software	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Extraktion.....	25
3.2.2	Reverse Transkription (RT-PCR)	25
3.2.3	Optimierung einer <i>env</i> -PCR	26
3.2.4	Qualitatives Agarose-Gel.....	28
3.2.5	Aufreinigung	29
3.2.6	Quantifizierung	30
3.2.7	Sanger-Sequenzierung.....	30
3.2.8	Auswertung von Sanger Sequenzen	31
3.2.9	Next generation sequencing (NGS).....	31
3.2.10	Auswertung der NGS-Sequenzen für den Vergleich mit Sanger.....	33
3.2.11	HIV-Subtypanalyse.....	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Optimierung einer <i>env</i> -PCR.....	36
4.2	Subtyp-generische Amplifikation der HIV-1 Subtypen	40
4.3	Bestimmung des Subtyps und des Ko-Rezeptorgebrauches in einem Evaluationspanel.....	41
4.3.1	Patienteneigenschaften	41
4.3.2	Subtypenverteilung.....	42
4.3.3	Vergleich verschiedener Ko-Rezeptorvorhersagemodelle	43
4.4	Vergleich des Ko-Rezeptorgebrauches in kürzlich-erworbenen und chronischen Infektionen aus Oktober bis Dezember 2014.....	45
4.4.1	Charakteristika der rezent- und chronisch-infizierten Patienten	45
4.4.2	Auswertung der Subtypenverteilung.....	47
4.4.3	Auswertung des Ko-Rezeptorgebrauches.....	49
4.4.4	Charakteristika der mit X4-Viren infizierten Patienten mit rezenter und chronischer Infektion	49
4.5	Vergleich der Ko-Rezeptorgebrauch-Vorhersage unter Verwendung von Sanger- und NGS-Sequenzen kürzlich-erworbener Infektionen.....	51
5	Diskussion.....	54
5.1	PCR-Optimierung.....	54
5.2	Sensitivität der <i>env</i> -PCR für HIV-1	56
5.3	Analyse des Ko-Rezeptorgebrauchs	56

5.3.1	Vergleich verschiedener bioinformatischer Vorhersage-Methoden anhand des Evaluationspanels	56
5.3.2	Anteil von X4-Viren bei rezenten und chronischen Infektionen anhand des Patientenpanels von 2014	57
5.3.3	Vergleich der Ko-Rezeptorvorhersage anhand von Sanger-und NGS-Sequenzen rezenter Infektionen.....	60
5.3.4	Limitation der Studie.....	61
5.4	Ausblick.....	62
6	Zusammenfassung.....	63
7	Summary.....	65
8	Danksagung	67
9	Literaturverzeichnis	68
10	Eidesstaatliche Erklärung.....	74
11	Anhang.....	75
11.1	Vergleich verschiedener computer-basierter Algorithmen für die Vorhersage des Ko-Rezeptorgebrauchs anhand eines Evaluationspanels	75
11.2	Subtypanalyse in rezenten und chronischen Infektionen.....	76
11.3	Verteilung des Ko-Rezeptorgebrauchs in rezenten und chronischen Infektionen ...	79
11.4	Korrelationsanalyse hinsichtlich des Ko-Rezeptorgebrauchs, der Viruslast und des CDC-Stadium bei Patienten mit Angaben zur CD4 ⁺ -Zahl	79
11.5	Vergleich X4/R5X4-Vorhersage anhand von Sanger und NGS-Sequenzen	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	cluster of differentiation 4
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CRF	zirkulierende rekombinante Form (circulating recombinant forms)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	auf Filter getropfte Seren HIV-Neudiagnosen (dried serum spots)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
env	envelope
FPR	Falschpositivrate (false positive rate)
gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HET	heterosexuelle Transmission
InzHIVsurv	Surveillance inzidenter HIV-Infektionen
IVD	intravenöse Drogenkonsumenten
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSM	Männer, die Sex mit Männern hatten
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pol	Polymerase
PSSM	Positions-spezifische-Score-Matrix
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SVM	Support Vektormaschine
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
URF	einzigartig rekombinante Formen (unique recombinant forms)
V3	hypervariable Domäne 3

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau und Struktur eines HIV-Virions [11].....	5
Abbildung 2 Struktur des HIV-1 Genoms [13]	6
Abbildung 3 Domänen des HIV-1-Env [14]	9
Abbildung 4 Aufbau des HIV-1 V3-Loops [16, 17].....	10
Abbildung 5 Vorgang des Viruseintritt bei HIV-1 [18].....	11
Abbildung 6 Konsensus-Sequenz des V3-Loops anhand des Subtyps B.....	13
Abbildung 7 Angriffspunkte Antiretroviraler Therapie (ART) bei HIV-1 [11]	16
Abbildung 8 Prinzip der RNA-Extraktion mit dem Biomerieux NucliSense® easyMAG™	25
Abbildung 9 Prinzip Agencourt AMPure XP Aufreinigung	29
Abbildung 10 Prinzip des Next Generation Sequencing (NGS) [39]	34
Abbildung 11 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten für die Optimierung der RT-PCR	36
Abbildung 12 Agarose-Gel (1%) mit den PCR-Produkten der Temperaturgradienten-PCR ..	37
Abbildung 13 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten der cDNA-Volumensoptimierung	37
Abbildung 14 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten der MgCl ₂ -Konzentrationsoptimierung...	38
Abbildung 15 Agarose-Gelbild mit PCR-Ausbeuten des symmetrischen Primertests.....	39
Abbildung 16 Agarose-Gel mit PCR-Produkten aus dem optimierten PCR-Protokoll.....	40
Abbildung 17 Subtyp CRF02_AG.....	43
Abbildung 18 Verteilung der Subtypen innerhalb des Evaluationspanels	43
Abbildung 19 Vergleich verschiedener Ko-Rezeptor-Vorhersagemodelle	44
Abbildung 20 Subtypenverteilung in dem Patientenpanel rezenter Infektionen	48
Abbildung 21 Verteilung der Subtypen unter den chronisch-infizierten Patienten	48
Abbildung 22 Verteilung X4/R5X4 und R5-Viren im Patienten-und Evaluationspanel	49
Abbildung 23 Vergleich Sanger-Sequenzierung mit dem NGS Grenzwert 20%	51
Abbildung 24 Vergleich der NGS Grenzwerte 10% und 20%	52
Abbildung 25 Nukleotidsequenzanalyse des V3-Loops der als X4 klassifizierten Viren	52
Abbildung 26 Aminosäuresequenzanalyse des V3-Loops der als X4 klassifizierten Viren....	53
Abbildung 27 Nukleotidsequenzanalyse des V3-Loops der als dualtrop klassifizierten Viren	53
Abbildung 28 Aminosäuresequenzanalyse des V3-Loops der dualtrop-klassifizierten Viren.	53
Abbildung 29 Phylogenetischer Baum anhand der <i>pol</i> -Genomregion	77
Abbildung 30 Phylogenetischer Baum anhand der <i>env</i> -Genomregion	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung der HIV-Erkrankung nach der CDC Klassifikation 1993 [11]	4
Tabelle 2 Einteilung der HIV-Erkrankung nach der Klassifikation von 2008 [11]	4
Tabelle 3 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription (RT).....	26
Tabelle 4 Mastermix für bereits etablierte env-PCR für Plasma-Proben.....	27
Tabelle 5 Zyklenprogramm für die etablierte env-PCR-Proben	27
Tabelle 6 Optimierungsschritte für die env -PCR	27
Tabelle 7 Zyklenprogramm Sanger Sequenzierung	31
Tabelle 8 Zusammensetzung des Mastermixes für die optimierte env -PCR	39
Tabelle 9 Zyklenprogramm für die optimierte env-PCR	40
Tabelle 10 Spezifität der env -PCR für die Subtypen A; CRF02_AG, C, D und G	40
Tabelle 11 Charakteristika der Serokonverter des Evaluationspanels (n=108)	41
Tabelle 12 Subtypverteilung im Evaluationspanel für die pol und env Genomregion	42
Tabelle 13 Charakteristika der nach BED in rezent- und chronisch-infizierte Patienten	46
Tabelle 14 Subtypverteilung innerhalb der kürzlich erworbenen Infektionen	47
Tabelle 15 Charakteristika der rezent eingestuft Patienten mit X4-Viren.....	50
Tabelle 16 Charakteristika der chronisch X4-viralen Infektionen	50
Tabelle 17 Anzahl der Substitutionen und Ambiguitäten in der V3-Nukleotidsequenz	52
Tabelle 18 Anzahl der Substitutionen und Ambiguitäten in der V3-Nukleotidsequenz	53
Tabelle 19 Vergleich verschiedener Vorhersagemodelle anhand des Evaluationspanels	75
Tabelle 20 Subtypverteilung der länger-bestehenden Infektionen	76
Tabelle 21 Verteilung des Ko-Rezeptorgebrauches im Patientenpanel	79
Tabelle 22 Vergleich FPR, Viruslast und CD4 ⁺ -Zahl anhand rezenter Infektionen	79
Tabelle 23 Korrelation zwischen klinischen Parametern und Ko-Rezeptor-Vorhersage	80
Tabelle 24 Vergleich FPR, Viruslast und CD4 ⁺ -Zahl anhand chronischer Infektionen.....	80
Tabelle 25 Korrelation zwischen klinischen Parametern und Ko-Rezeptor-Vorhersage	81
Tabelle 26 Vorhersage von X4 und R5X4-Viren anhand von Sanger-und NGS-Sequenzen	82

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Ursprung und Klassifikation des Humanen Immundefizienz Virus (HIV)

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) wurde erstmals 1981 im Zusammenhang mit einer plötzlich auftretenden Immunschwäche [1], insbesondere bei homosexuellen Männern, beschrieben. Seit 1983 ist der Erreger der Erkrankung international als HIV bekannt.

Das Virus gehört zu der Virusfamilie der Retroviren und wird der Gattung der Lentiviren zugeordnet [2]. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich das HI-Virus in Folge einer Zoonose aus dem Simian Immundefizienz Virus (SIV) der Affen entwickelte [3].

Bislang sind zwei Virustypen beschrieben, die AIDS auslösen können – HIV-1 und HIV-2. Das Vorkommen von HIV-2 beschränkt sich auf Westafrika [4].

HIV-1 ist hingegen weltweit vertreten. Das Virus kann in verschiedene Gruppen, Subtypen und zirkulierende rekombinante Formen (CRF) unterschieden werden.

Bislang sind vier Gruppen: M (major), N (non M non O), O (outlier) sowie P bekannt [5].

N ebenso wie O kommen nur sporadisch vor und begrenzen sich meist auf den Raum Kamerun.

Zirka 97% der Infektionen werden von Viren der Gruppe M verursacht. Viren dieser Gruppe werden in 9 Subtypen (A – K) sowie in 79 rekombinante Formen unterteilt. Die Einteilung basiert auf ihrer genetischen Diversität sowie Mutationsmustern und Rekombinationen. Weltweit tritt der Subtyp C am häufigsten (48%) auf. Er ist in Sub-Sahara Afrika ebenso wie in Zentralasien prävalent. Der Subtyp A und die vom ihm abgeleiteten CRFs machen zirka 25% aller HIV-1 Infektionen weltweit aus. Sie treten in Osteuropa sowie in West-und Zentralafrika und Pakistan auf. In Europa, Nordamerika und Australien sowie Japan ist vor allem der Subtyp B prävalent. Weltweit sind 11% der HIV-1 Infektionen mit diesem Subtyp assoziiert [6]. Die Subtypen D bis K und verschiedene rekombinante Formen des Virus sind besonders in Afrika verbreitet [4].

1.2 Epidemiologie

Nach Schätzungen von UNAIDS, dem Gemeinsamen Programm der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS, waren 2014 weltweit 36,9 Mio. Menschen mit dem Virus infiziert, darunter zirka 2 Mio. Neuinfektionen.

In Deutschland waren 2014 rund 83.000 Menschen mit HIV infiziert [7]. Bis zum 01.03.2015 wurden für das Jahr 2014 3.525 gesicherte Neudiagnosen an das Robert-Koch-Institut Berlin

gemeldet. In den letzten Jahren blieb die Anzahl der gesicherten HIV Neudiagnosen nahezu konstant. Männer sind häufiger betroffen als Frauen, so wurden 81.2% der Neudiagnosen 2014 bei Männern registriert.

Die Übertragung erfolgt in Europa und Nordamerika häufig bei Männern, die Sex mit Männern hatten (MSM), aber auch durch heterosexuellen Kontakt und beim Drogenkonsum.

In Deutschland waren 68% aller HIV-Neudiagnosen von Personen der Transmissionsgruppe MSM zu verzeichnen. 28% der Neudiagnosen konnten bei Personen mit einem heterosexuellen Transmissionsrisiko (HET) nachgewiesen werden. Konsumenten intravenös verabreichter Drogen (IVD) nahmen 4% der HIV-Neudiagnosen ein und stellen die drittgrößte Transmissionsgruppe dar [8].

1.3 Studien zum Monitoring der HIV-Epidemie am Robert Koch-Institut

Seit 1988 sind Diagnostiklabore in Deutschland nach §7(3) des Infektionsschutzgesetzes dazu verpflichtet HIV-Neudiagnosen nichtnamentlich an das Robert Koch-Institut (RKI) zu melden. Daraus lässt sich zwar die HIV-Prävalenz in Deutschland, aber nicht der Infektionszeitpunkt und somit auch nicht der Anteil neuer HIV-Infektionen (HIV-Inzidenz) ableiten.

Eine Klassifikation in kürzlich erworbene (<155 Tage [9]) oder länger bestehende (> 155 Tage) HIV-Infektionen kann mit kommerziell erhältlichen serologischen „HIV-Rezent-Tests“ (BED-CEIA, Firma Calypte) erfolgen. Dieser HIV-ELISA basiert auf den proportionalen Titeranstieg HIV-spezifischer Antikörper während der Infektion.

Für die Studie – „Surveillance inzidenter HIV-Infektionen“ (InzHIVSurv) werden aus 81 nationalen HIV-Diagnostiklaboren Filterproben (engl. dried serum spots (DSS)), auf denen das Restserum von HIV-Neudiagnosen getropft wurde, zusammen mit anonym erhobenen Meldebögen an das RKI gesandt.

Obwohl der BED-CEIA weltweit verwendet wird, zeichnet ihn eine geringe Sensitivität und Spezifität aus, deshalb wird das Einbeziehen klinischer Daten in den Algorithmus empfohlen, um die Wahrscheinlichkeit einer Fehlklassifikation zu reduzieren.

Die Studie „Molekulare Surveillance von HIV“ überwacht das Infektionsgeschehen auf virusgenetischer Ebene. Dabei stehen das Vorkommen und die Verbreitung der zirkulierenden Virusvarianten hinsichtlich ihrer Resistenten und Subtypen im Fokus.

Durch das Einbeziehen soziodemographischer Daten aus den Meldebögen können Virusvarianten identifiziert werden, die am aktuellen Infektionsgeschehen in den verschiedenen Transmissionsgruppen beteiligt sind.

Neben der Inzidenzstudie ist die Serokonverter-Studie ein Bestandteil der Molekularen Surveillance. Hierbei handelt es sich um eine longitudinale prospektive Studie, die 1997 in

Deutschland begann und über jährliche Verlaufskontrollen die virale intrapatienten Evolution erfasst.

Akute HIV-1 Serokonverter sind definitionsgemäß Patienten, die negativ auf anti-HIV-1 Antikörper getestet wurden, aber positiv für Plasma HIV-1 RNA sind. Es sind auch Patienten, die einen positiven HIV-1 Antikörpertest haben, aber zunächst negativ oder als fraglich im Immunoblot eingestuft wurden und erst später ein positives Ergebnis erhielten. Als dokumentierte Serokonverter werden auch HIV-Patienten bezeichnet, von denen ein seronegatives Testergebnis vorliegt, das nicht länger als 3 Jahre vor der Erstdiagnose erhalten wurde [10].

1.4 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Bei HIV-positiven, therapie-naiven Patienten kann HIV frei zirkulierend oder in infizierten Zellen des Blutes, im Sperma oder Genitalsekret sowie in der Muttermilch vorkommen.

Eine Übertragung erfolgt meist auf dem sexuellen Transmissionsweg, aber auch durch kontaminierte Nadeln oder Blutprodukte. Eine vertikale Transmission des Virus von der Mutter auf das Kind ist während der Schwangerschaft, bei der Geburt oder beim Stillen möglich.

Die Primärinfektion von HIV verläuft meist inapparent. Bei 20-30% der Patienten treten jedoch grippe – oder mononukleoseähnliche Symptome auf.

Auf die akute virämische Phase (7 – 10 Tage nach Infektion) folgt nach 3-4 Wochen die Serokonversion, in der HIV-Antikörper nachweisbar sind.

Das Virus verbreitet sich über die Blut- und Lymphgefäße. Die Virusreplikation erfolgt überwiegend in den Lymphknoten und anderen lymphatischen Organen. Dies führt zunächst zu einer Hyperplasie des Organes, die mit einer Schwellung der Lymphknoten in Erscheinung tritt (Kategorie A).

Pro Tag werden bis zu $1,0E+10$ Viren gebildet, die ebenso viele CD4⁺-Zellen infizieren und durch den zytopathischen Effekt sowie durch induzierte apoptotische Prozesse zerstören. Dies entspricht zirka 5% der Gesamtpopulation.

Durch einen natürlichen schnellen Turn-Over der CD4-tragenden T-Zellen ist es möglich dem rapiden Zelluntergang zu kompensieren solange die lymphatischen Organe weitreichend intakt sind. Zusätzlich werden zirkulierende Viren durch das Immunsystem eliminiert.

Mit fortschreitender Infektion und Zerstörung lymphatischer Gewebe kann der Verlust nicht mehr hinreichend ausgeglichen werden. Es folgt die symptomatische Phase, das sogenannte AIDS-Stadium.

Mit dem Untergang der CD4-tragenden T-Lymphozyten sowie Makrophagen und Dendritischen Zellen kann die Immunantwort nicht ausreichend reguliert werden, da die Ausschüttung von immunmodulierenden Botenstoffen, welche für die Rekrutierung von zytotoxischen CD8-T-Zellen und anderen Immunzellen benötigt werden, zum Erliegen kommt. Dadurch treten verstärkt opportunistische Infektionen sowie Tumore auf, welche ohne Behandlung bis zum Tod führen [2].

Das erste Auftreten opportunistischer Infektionen, die assoziiert sein können mit chronischen Fieberzuständen, Diarrhöe, Nachtschweiß und Gewichtsverlust, werden als AIDS-related complex (ARC) bezeichnet (Kategorie B). Aus diesem geht schließlich das AIDS-Stadium hervor, in dem weitere opportunistische Infektionen wie *Pneumocystis carinii*-induzierte Lungenentzündungen und Tumore wie das Kaposi Syndrom auftreten (Kategorie C).

Entsprechend der Symptomatik (Tab. 1) und der CD4⁺-Zahl wird die HIV-Infektion nach dem Zentrum für Krankheitskontrolle und Prävention (Center for Disease Control and Prevention (CDC)) wie folgt klassifiziert:

Tabelle 1 Einteilung der HIV-Erkrankung nach der CDC Klassifikation 1993 [11]

Klinik / CD4-Zellen	asymptomatisch oder akute HIV-Krankheit	Symptomatisch aber nicht A oder C	AIDS-Erkrankung*
> 500/ μ l	A1	B1	C1
200–499/ μ l	A2	B2	C2
< 200/ μ l	A3	B3	C3

2008 wurde diese Klassifikation schließlich überarbeitet, um ein vereinfachtes Monitoring sowie eine verbesserte Diagnostik und Therapie zu gewährleisten (Tab. 2). Hierfür wurde eine vierte Kategorie eingeführt, in der die CD4⁺-Zahl ebenso wie die Krankheitsvorgeschichte des Patienten unbekannt ist:

Tabelle 2 Einteilung der HIV-Erkrankung nach der Klassifikation von 2008 [11]

Stadium	AIDS-Erkrankungen*	CD4-Zellen
1	keine	> 500/ μ l oder \geq 29 %
2	keine	200–499/ μ l oder 14–28 %
3	Dokumentierte AIDS-Erkrankung	oder < 200/ μ l oder <14 %
unbekannt	Keine Information vorhanden	Keine Information vorhanden

1.5 Aufbau und Struktur

Die infektiösen HI-Viruspartikel weisen wie alle Retroviren eine Größe von zirka 100 nm auf. Das konische Kapsid wird von dem Kapsidantigen p24 gebildet. Es umschließt zwei Kopien viraler RNA, die mit den Nukleoproteinen p7 komplexiert sind. Im Inneren des Virus sind die Enzyme Integrase, Reverse Transkriptase und Protease, sowie eine Virus-spezifische tRNA vorhanden [2]. Um das Kapsid befindet sich eine Lipoproteinhülle, in die Glykoproteinkomplexe eingelagert sind. Diese bestehen aus einem externen Oberflächenanteil gp120 und einer Transmembranregion, dem gp41. Beide Domänen sind über nicht kovalente Bindungen miteinander verknüpft und als Trimer in die Membran eingelassen. Neben den Virusproteinen sind zusätzlich zelluläre Oberflächenproteine wie das Humane lymphatische Antigen (HLA) oder das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) an der Virusoberfläche auszumachen. Die Innenseite der Virushülle wird von dem Matrixprotein p17 ausgekleidet [11] (Abb. 1).

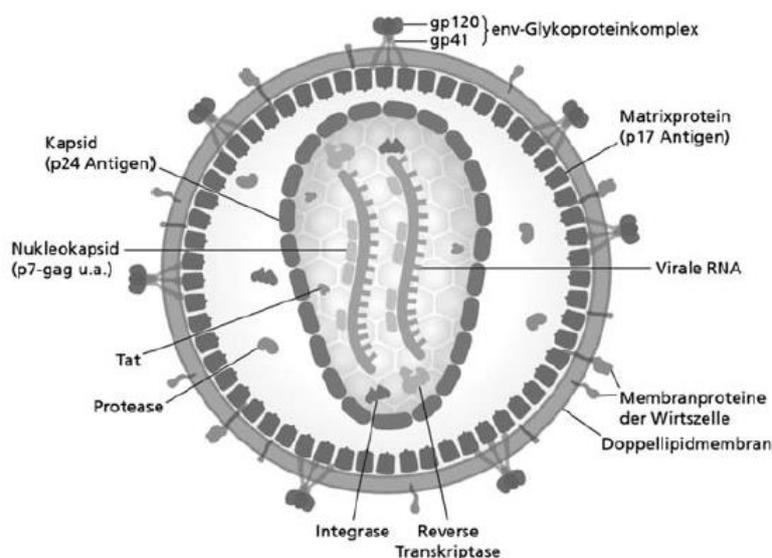


Abbildung 1 Aufbau und Struktur eines HIV-Virus [11]

1.6 Genomaufbau

Ebenso wie andere Retroviren verfügt auch das HI-Virus über eine lineare ss(+) RNA, die ähnlich einer eukaryotischen mRNA am 5' Terminus eine Cap-Struktur und am 3' Ende eine Polyadenylierung aufweist. Aufgrund drei überlappender offener Leserahmen (ORF – open reading frames) verfügt das Virus über einen erhöhten Kodierungsbereich. Die viralen Genomregionen, welche für das Gruppen-spezifische Antigen (Gag), die enzymatische Aktivität (Pol) und die Glykoproteine (Env) kodieren, sind flankiert von regulatorischen Kontrollsequenzen, den *long terminal repeats* (LTR) (Abb. 2):

Am 5' Ende der viralen RNA folgt auf das Cap eine redundante (R) Domäne und eine U5-Region (U – unique). Letztere enthält Informationen für die Integration des Virusgenoms in die zelluläre DNA. Der U5-Region schließt sich eine Primerbindungsstelle an (PB), welche Bindungsstellen für die Virus-spezifische transfer RNA (tRNA) aufweist. Zwischen der Primerbindungsstelle und der ersten viralen Genomregion befindet sich die *Leader*-Sequenz mit dem ψ -Verpackungssignal, das für die spätere Morphogenese des Virus essentiell ist. Nach den für die Proteine kodierenden Sequenzen folgt am 3' Ende der Polypurintrakt (PP), welcher die Reverse Transkription initiiert. Am 3' ebenso wie am 5' Terminus der viralen RNA befindet sich die U3- und U5 Region als auch die redundante Domäne R.

Neben den bei allen Retroviren gemeinsamen *gag*, *pol* und *env*-Genombereichen verfügt HIV über sechs weitere kodierende Regionen. Zwei von ihnen sind essentiell für die Virusreplikation. Sie kodieren für den Transaktivator und den Regulator der Transkription (*tat* und *rev*). Vier weitere für die Replikation nicht notwendige akzessorische Regulatorproteine werden im Genom kodiert:

Der virale Infektionsfaktor (*vif*) interagiert mit dem zellulären Restriktionsfaktor ABOBEC3 und inhibiert diesen. ABOBEC3 initiiert andernfalls Mutationen in das HIV-Genom und vermindert die Infektiosität des Virus. Das virale Protein R (*vrp*) versetzt die Zelle in einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. Dies ist besonders in nicht-teilenden Zellen von großer Bedeutung. Das virale Protein U (*vpu*) verstärkt die Freisetzung der Viruspartikel indem es den Restriktionsfaktor Tetherin inhibiert, daraufhin werden vermehrt CD4-Rezeptoren abgebaut [12]. Dies wird durch ein weiteres Regulatorprotein unterstützt: Der Negativfaktor (*Nef*) vermindert die Expression und den Transport des CD4-Rezeptors, der Ko-Rezeptoren sowie des Humanen lymphatischen Antigens II (HLA-II) durch das Eingreifen in zelluläre Signalwege. Auf diese Weise werden die Antigenpräsentation und damit die T-Zellaktivität negativ beeinflusst. Die Virusreplikation innerhalb der Zelle wird jedoch verstärkt [2].

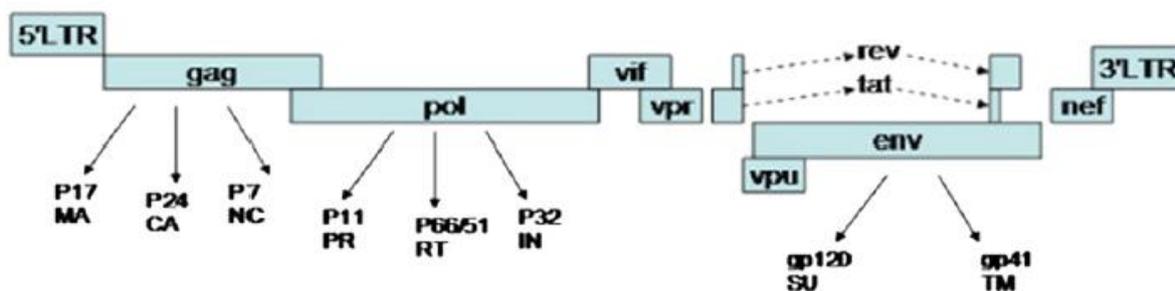


Abbildung 2 Struktur des HIV-1 Genoms [13]

1.7 Replikationszyklus

Der Viruseintritt beginnt mit der Bindung des HIV-Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor und den Ko-Rezeptor der Zelle. Nach Fusion der Virushülle und der Zellmembran wird das Viruskapsid in das Zytoplasma entlassen. Dort erfolgt die Umschreibung der viralen RNA in provirale lineare DNA. Dieser Prozess wird durch die virale Reverse Transkriptase (RT) vermittelt. Das Enzym verfügt über keine proof-reading-Funktion. Dies führt zu einer erhöhten Mutationsrate innerhalb der generierten proviralen DNA. Es entstehen replikationsfähige aber auch replikationsdefiziente Viren. Neben diesen etablieren sich auch genetisch-verschiedene Virusvarianten, die sogenannten „Quasispezies“.

In ruhenden Immunzellen verbleibt die provirale DNA zunächst im Zytosol. Erst mit der Aktivierung der Zelle wird die Virus-DNA unter Einwirkung eines weiteren viralen Enzyms, der Integrase, in das zelluläre Genom integriert. Die Integrase erzeugt hierbei überlappende Enden sowohl in der proviralen als auch in der zellulären DNA und ermöglicht so den Einbau. Durch die Bindung des Virus an den Ko-Rezeptor CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5) oder CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4) werden verschiedene Signalwege aktiviert, u.a. der Nukleare Faktor „kappa light chain enhancer“ von aktivierten B-Zellen (NFkB)-Weg. Es wurde bereits postuliert, dass NFkB an die LTR-Region der proviralen DNA bindet und die Transkription durch die zelluläre Polymerase II stimuliert [2].

In der frühen Phase des Infektionszyklus entstehen gespleißte und ungespleißte messenger RNAs (mRNA). Zunächst werden nur die mehrfach gespleißten RNAs in das Zytosol exportiert, wo schließlich auch die Translation erfolgt. Daraus resultieren die frühen regulatorischen Proteine: Tat, Rev sowie Nef, welche anschließend zurück in den Kern transportiert werden. Tat als Transkriptionsaktivator bindet an das Trans-acting response element (TAR) innerhalb der viralen DNA. Zusammen mit dem zellulären Ko-Faktor Cyclin T1 stimuliert es die Transkription und führt verstärkt zu der Bildung langer gespleißter bzw. ungespleißter mRNAs. Das ebenfalls exprimierte Rev-Protein fungiert als nukleärer Exportfaktor. Es bindet an das rev-response element (RRE) einfach gespleißter oder ungespleißter RNA und transportiert sie in das Zytoplasma der infizierten Zelle [12]. Einfach gespleißte RNAs kodieren für die env-Proteine, sowie für die regulatorischen Proteine Vpu, Vif, Vpr. Ungespleißte RNA enthält hingegen die Information für Gag und Gag/Pol-Proteine. Ein Teil dieser RNA wird ebenfalls als genomische RNA in die entstehenden Viruspartikel eingelagert.

Die viralen Polyproteine Gag, Gag-Pol und Env werden zunächst als Vorläufermoleküle synthetisiert, die im weiteren Verlauf des Infektionszyklus prozessiert werden. Die Env-Proteine werden schließlich in die Plasmamembran inkorporiert.

Gag- ebenso wie der Gag/Pol-Vorläufer und einige übrige Virusproteine werden an freien Ribosomen im Zytosol translatiert. Während der Synthese erfolgt eine Myristylierung an dem N-Terminus der Vorläufermoleküle. Diese posttranslationale Modifikation ermöglicht den Transport durch zelluläre Proteine zur Plasmamembran und die Anlagerung daran.

An der Plasmamembran erfolgt die Morphogenese der Viruspartikel. Zwei Kopien der *full-length* HIV-RNA akkumulieren über intrazelluläre Wechselwirkungen mit dem Gag und dem Gag/Pol-Vorläufermolekül. Es formiert sich das virale Kapsid, das mit der Transmembranregion der viralen Env-Proteine an der Zellmembran interagiert, wodurch ein behülltes Virus entsteht, das von der Zelloberfläche abgeschnürt wird (budding).

Erst die autokatalytische Spaltung der Vorläufermoleküle Gag- und Gag/Pol durch die virale Protease führt zu der Entstehung reifer Viruspartikel und zu einem erfolgreichen Infektionszyklus. Die Protease ist nur in den von der Zelle freigesetzten Viruspartikeln aktiv, da die Vorläuferproteine andernfalls bereits im Zytosol gespalten und so die Integrität in der Plasmamembran verlieren würden [2].

1.7.1 Die Hüllproteine von HIV

1.7.1.1 Biogenese

Die Hüllproteine (envelope (Env)) gp 120 und gp41 gehen aus dem Vorläufermolekül gp160 hervor (Abb. 3), das aus der einfach gespleißten vpr/env mRNA am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) translatiert wird. Dieser Prozess wird durch das endständige Signalpeptid (SP) eingeleitet.

Die Synthese der entstehenden Aminosäurekette erfolgt in das ER-Lumen bis zu einer hydrophoben Domäne im transmembranen Proteinanteil, der das Molekül in der ER-Membran verankert [2]. Nach Beendigung der Translation wird das Signalpeptid abgespalten und der N-Terminus durch N-verknüpfte Oligosaccharide glykosyliert. Die einzelnen gp160 Monomere oligomerisieren schließlich zu Trimeren und werden über den sekretorischen Weg zum Golgi-Apparat transportiert. Dort erfolgen weitere Modifikationen sowie die Spaltung des Proteins in gp120 und gp41. Die Prozessierung wird durch Furin oder durch eine Furin-ähnliche Protease katalysiert. Trotz der Spaltung bleiben die beiden Glykoproteine über eine nicht-kovalente Bindung mit einander verbunden. Die Trimere aus dem gp120-gp41 Komplex formieren sich zu einem Glykoproteinspike, der zur Plasmamembran transportiert und in die virale Hülle inkorporiert wird.

Um die Immunreaktion zu umgehen, werden die Env-Proteine nur in geringer Konzentration in die Plasmamembran eingebaut. Demnach müssen die einzelnen Moleküle stets abgebaut und wieder neu zur Verfügung gestellt werden [14].

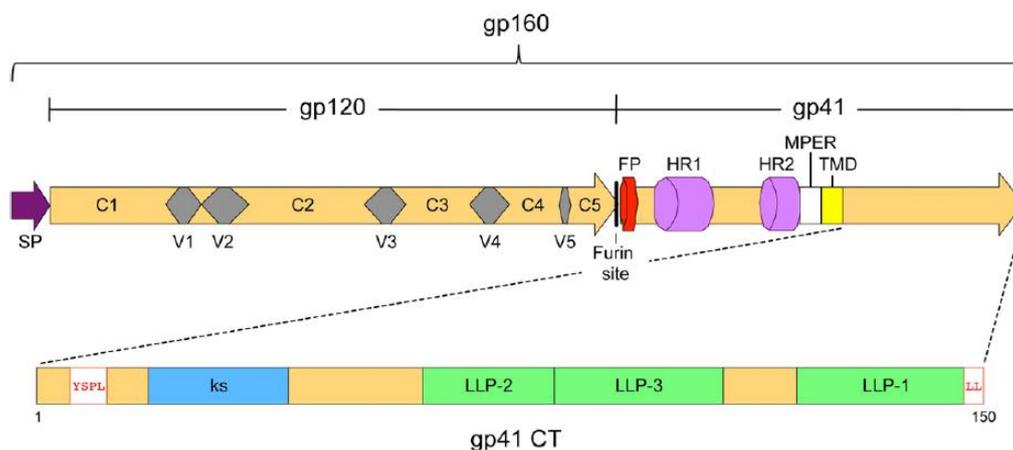


Abbildung 3 Domänen des HIV-1-Env [14]

1.7.1.2 Struktur des gp120

Das Glykoprotein 120 von HIV-1 besteht aus 5 variablen (C1-C5) sowie 5 konservierten Domänen (V1-V5) (Abb. 3). Diese Struktur sowie zahlreiche Glykosylierungsstellen verleihen dem Molekül eine hohe Diversität und unterstützen die Immunevasion. Hinzukommen die genetische Variabilität, welche durch die Fehlerrate der Reversen Transkriptase gegeben ist [2].

Gp120 verfügt über zahlreiche konservierte Cysteinreste, die über Disulfidbrücken dem Protein seine drei-dimensionale Struktur geben [14]. Die konservierten Domänen bilden den Kern des gp120, wohingegen die variablen Domänen an der Oberfläche als Schleifen exponiert werden, die über Disulfidbrücken verankert sind [13]. Die variablen Domänen 4 und 5 (V4, V5) tragen zu der Bindung des CD4-Rezeptors bei. V3 hingegen ist mit dem Ko-Rezeptorgebrauch assoziiert.

Das V3-Loop ist über einen konservierten antiparallelen Strang mit dem restlichen gp120-Molekül verbunden. Die darauffolgende Stammregion ist variabel und hoch flexibel. Sie geht in ein konserviertes turn-GPGR-Motiv (Glyzin, Prolin, Gylzin, Arginin) über [15] (Abb. 4).

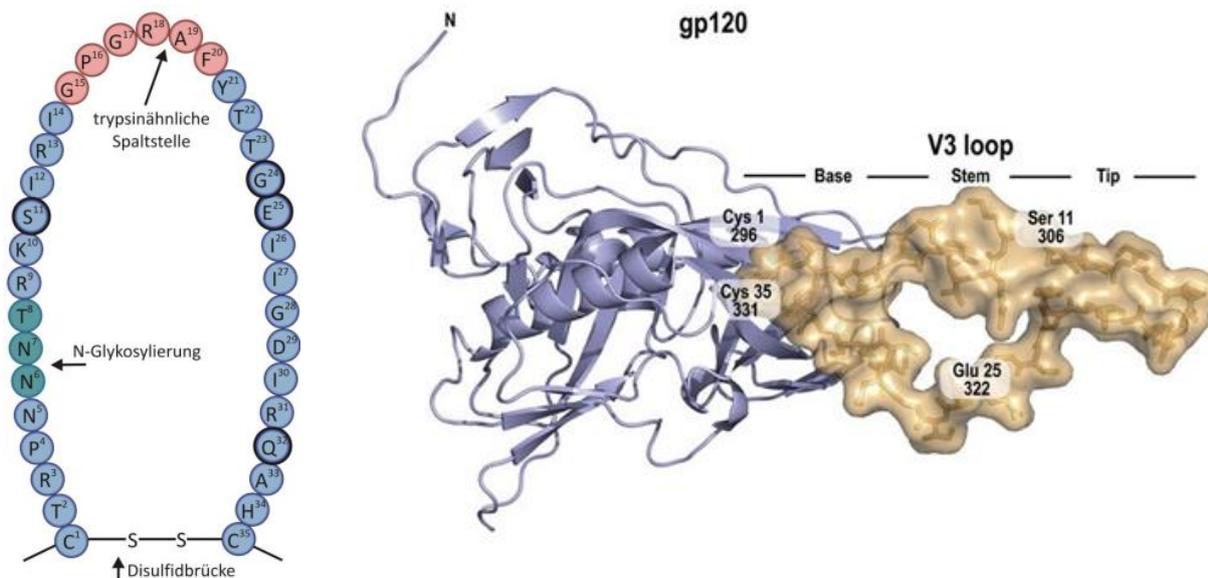


Abbildung 4 Aufbau des HIV-1 V3-Loops [16, 17]

Das V3-Loop ist charakterisiert durch eine hypervariable Stammregion, welche Glykosylierungsstellen aufweist (grün). Innerhalb dieser Stammregion sind insbesondere die Positionen 11, 24 und 25, sofern an diese Stellen basische Aminosäuren inseriert werden, mit einer Veränderung des Ko-Rezeptorgebrauchs assoziiert und der damit einhergehenden Synzytienbildung (fett gedruckt). An der Spitze des Loops befindet sich schließlich das konservierte GPGR-Motiv.

1.7.1.3 Struktur des gp41

Das zweite Protein, das aus der Prozessierung des gp160 hervorgeht, ist gp41. Es besteht aus 345 Aminosäuren, die drei Domänen ausbilden: eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne.

Die extrazelluläre Domäne, welche auch als Ektodomäne bezeichnet wird, vermittelt die fusiogene Eigenschaft des Proteins. Am N-Terminus verfügt es über das hydrophobe Fusionsprotein, dem durch polare Regionen unterbrochen, zwei ebenfalls hydrophobe N-terminale und C-terminale heptamere repeats (HR) folgen. Diese repeats sind als α -helikale coil-coiled Strukturen angeordnet und über Disulfidbrücken miteinander verbunden [14, 13]. Ebenfalls in der Ektodomäne enthalten ist die 24 Aminosäuren große hochkonservierte proximale externe Membranregion (MPER), welche die Fusiogenität aber auch die Virusinfektiosität verstärkt.

Der konservierte Transmembrananteil des gp41 verankert schließlich das Env-Molekül in der viralen Lipidmembran. Die darauffolgende intrazelluläre Domäne besteht aus drei konservierten amphiphatischen α -helikalen Segmenten, die als lentivirale lytische Peptide (LLP1-3) bezeichnet werden (Abb. 3). Sie beeinflussen die Eigenschaften des gp120/gp41 Komplexes und vermitteln hierbei die Fusion, die Proteinstabilität, die Multimerisierung ebenso wie die Expression und Inkorporation an der Zelloberfläche [14].

1.7.2 Der molekulare Mechanismus des Viruseintritts

Der Viruseintritt definiert die Bindung eines Virus an zelluläre Oberflächenproteine, in dessen Folge die virale Hülle mit der Plasmamembran der Wirtszellen fusioniert.

Drei gp120-gp41 Komplexe bilden den Env-Trimer. Das virale Hüllprotein gp120 bindet über seine konstanten Regionen an die hoch-konservierte Bindungsstelle des CD4-Rezeptors. Dies führt zu einer starken Konformationsänderung innerhalb des gp120-Moleküls, bei der die variablen Domänen V1/V2 sowie V3 verschoben werden. Daraus resultiert das sogenannte *bridging sheet*, das aus zwei anti-parallelen β -Faltblättern besteht, welche die äußere und innere Domäne des gp120 miteinander verbinden. Die V3-Domäne wird in dieser Konformation zur Zelloberfläche ausgerichtet und bestimmt damit direkt die Ko-Rezeptorbindung [13].

Nachdem gp120 den Rezeptor und Ko-Rezeptor auf der Zelloberfläche gebunden hat, erfolgen weitere strukturelle Veränderungen in dem gp120-gp41 Komplex [14], in dessen Konsequenz das N-terminale Fusionsprotein des gp41 in die Zellmembran inseriert wird. Dies führt zur einer Umbildung der N- sowie der C-heptameren repeat Helices, welche nun ein thermostabiles Sechs-Helix-Bündel mit einem weiteren Env-Trimer [18] ausbilden und die Fusion zwischen der Virushülle und der Zellmembran ermöglichen [13].

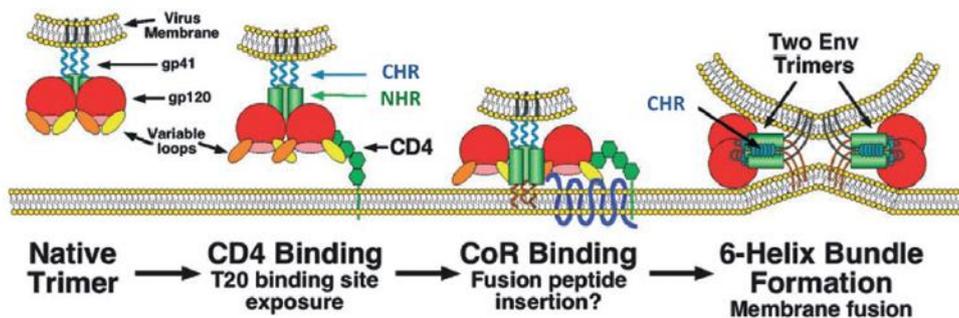


Abbildung 5 Vorgang des Viruseintritt bei HIV-1 [18]

1.8 Der Ko-Rezeptorgebrauch des HIV-1

1.8.1 Wirtstropismus

Bereits kurz nach der Entdeckung von HIV konnte der CD4 Rezeptor als primärer Rezeptor identifiziert werden. Es zeigte sich jedoch früh, dass dieser Rezeptor allein nicht für einen effizienten Viruseintritt ausreichen würde. 1989 erkannte eine schwedische Arbeitsgruppe bei *in vitro* Studien, dass sich während der HIV-Infektion ein Wandel des Wirtstropismus ereignet, der mit phänotypischen Veränderungen der Zellen einhergeht [19].

Basierend auf diesen Beobachtungen erfolgte die Einteilung nach den präferierten Zelltypen in Makrophagen-trope (M-trope) und T-Zelltrope (T-trope) Viren. Circa zehn Jahre später wurden die entsprechenden Ko-Rezeptoren entdeckt. M-trope Viren binden demnach den Chemokinrezeptor CCR5 [20], während T-trope Viren CXCR4 als Ko-Rezeptor benötigen. Sie werden entsprechend ihres Ko-Rezeptortropismus als R5- oder X4-Viren bezeichnet [21].

Die vorherrschende Meinung ist, dass zu Beginn der HIV-Infektion das Virus überwiegend an den CD4 sowie an den CCR5 Rezeptor bindet, der von Makrophagen, Dendritischen Zellen und zirkulierenden T-Zellen exprimiert wird [22]. Das Virus repliziert zunächst nur sehr langsam. In diesem Stadium ist kein zytopathischer Effekt, wie die für HIV typische Synzytiumbildung, zu beobachten.

Mit fortschreitender Infektion erfolgt bei 50% der Patienten mit HIV des Subtyps B der Übergang vom CCR5 zum CXCR4-Rezeptor als präferierten Ko-Rezeptor. Das Virus repliziert sich nun schneller und effizienter. Auch ruhende und naive T-Zellen werden infiziert [22]. Die Zellen neigen nun verstärkt zur Ausbildung von Synzytien.

Die Veränderung des Wirtstropismus ist mit einer erhöhten Viruslast sowie der Abnahme der CD4⁺-Zellen assoziiert. Es steht damit in direkter Verbindung zu einer schnellen Progression von AIDS und den daraus resultierenden Konsequenzen [23].

Neben X4 und R5-Viren sind auch dual-trope (M/T-trope bzw. X4R5) Viren am Infektionsgeschehen beteiligt. Sie können sowohl den CCR5 als auch den CXCR4 Rezeptor binden. Es wird davon ausgegangen, dass sie Zwischenstufen darstellen, die sich während des Überganges ausbilden. Die Viruspopulation ist sehr heterogen [11]. Reine X4-Viren treten nur selten *in vivo* auf, meist sind sie in einer dualtropen oder Mischpopulation (D/M) präsent [22].

Der Zelltropismus und der Zeitpunkt des Übergangs von R5- zu X4-Viren können unter den verschiedenen HIV-Subtypen und zirkulierenden rekombinanten Formen variieren. Analysen der V3-Konsensussequenz ergaben, dass in CRF 19_cpx bereits sehr früh der Wandel zu CXCR4 als Ko-Rezeptor erfolgt [24].

1.8.2 Bestimmung des Ko-Rezeptorgebrauchs

Die Ermittlung des Ko-Rezeptorgebrauchs kann phänotypisch oder genotypisch erfolgen. Phänotypische Assays sind zellbasierende Tests wie der Trofile®-Assay, die zwar sehr spezifisch und sensitiv, aber auch zeit – und kostenaufwändig sind. Deshalb werden verstärkt genotypische Methoden verwendet, um das Auftreten von X4-Viren auszuschließen und um CCR5-Antagonisten für die Therapie berücksichtigen zu können.

Diese *in silico*-Analysen bestimmen mit Hilfe eines Computeralgorithmus den Ko-Rezeptorgebrauch. Verschiedene Algorithmen fokussieren hierbei besonders auf die V3-Region, da sie den Ko-Rezeptorgebrauch überwiegend bestimmt und zudem über hochkonservierte Regionen verfügt [25].

Die ersten Vorhersage-Methoden basierten auf den Beobachtungen von Raymond et al., dass Mutationen insbesondere an Position 11 und 25 zu der Veränderung des Tropismus von CCR5 zu CXCR4 beitragen. Daraus resultierte die 11/25-Regel, die von Raymond et al. für die Vorhersage des Ko-Rezeptorgebrauchs etabliert wurde [26]. Bereits eine Mutation zu der basischen Aminosäure Lysin (K) oder Arginin (R) an einer der Positionen ist mit dem Übergang zu X4-Viren assoziiert.

Diese Faustregel wird häufig in Verbindung mit der Nettoladung verwendet.

TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA CCA GGG AGA GCA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT TGT
 Consensus B: C T R P N N N T R K S I H I G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C

Abbildung 6 Konsensus-Sequenz des V3-Loops anhand des Subtyps B

Markiert sind die Aminosäurepositionen 11 und 25, bei denen Mutationen den Ko-Rezeptorgebrauch beeinflussen. So führt der Einbau einer positiv-geladenen Aminosäure an einer der Positionen zum Übergang zu X4-Viren

Die Nettoladung berechnet sich aus den Anteilen positiv und negativ geladener Aminosäuren innerhalb des V3-Loops (Arginin, Lysin bzw. Glutamin- und Asparaginsäure) wie folgt:

$$\text{Nettoladung} = (\text{Arginin (R)} + \text{Lysin (K)}) - (\text{Asparaginsäure (E)} + \text{Glutaminsäure (D)})$$

positiv geladen

negativ geladen

Eine Nettoladung ≤ 4 wird meist mit dem Ko-Rezeptor CCR5 in Verbindung gebracht. Nettoladungen ≥ 5 sind hingegen mit X4-Viren assoziiert.

Mittlerweile ist bekannt, dass mit fortschreitender Infektion verstärkt basische Aminosäuren innerhalb des V3-Loops inseriert werden und dass verschiedene Mutationen innerhalb des V3-Loops zu einem Übergang zu X4-Viren führen, sodass die 11/25 Regel allein nicht mehr ausreicht [27]. Die heutigen Algorithmen wurden daher mit statistischen Lernmethoden trainiert wie der Support Vektor Maschine (SVM) oder der Positionsspezifischen Score-Matrix (PSSM),

dadurch soll die Genauigkeit der Vorhersage verbessert werden. Die 11/25-Regel kommt in diesen Algorithmen nur noch bei Grenzfällen zur Anwendung.

Kürzlich wurde postuliert, dass für eine präzise Vorhersage neben der Nukleotid- oder Aminosäuresequenz des V3-Loops auch die Glykosylierungsstellen in die Berechnungen einbezogen werden sollten [26], denn der zusätzliche Verlust von N-Glykosylierungsstelle, insbesondere an Position g15 von V3 verstärken den Übergang zu X4-Viren und unterstützen die Progression von AIDS.

Der Verlust von Glykosylierungsstellen besonders in der späten Phase der Infektion scheint riskant. Allerdings ist das Immunsystem zu diesem Zeitpunkt sehr geschwächt und durch die Demaskierung des Virus wird die Effizienz des Viruseintrittes verstärkt [15].

1.8.3 Vorhersage-Methoden zur genotypischen Bestimmung des Ko-Rezeptorgebrauches

Methode	Geno2pheno_[coreceptor] original	Geno2phenoC-NGS-Sanger	Position specific scoring Matrix (PSSM)	HIVcoPred
Analysierte Struktur: V3-Loop				
Sequenz	Nukleotid	Nukleotid	Nukleotid-/Aminosäure	Aminosäure
Berechnungsmodell	trainiert mit klonalen Sequenzen (Subtyp B und C) in support vector machine (SVM) Einbeziehen klinischer Daten möglich (g2p +/- Klinik)	trainiert mit NGS-Sequenzen bisher nicht klinisch validiert	trainiert mit Sequenzen generiert aus phänotypischen Assay: direkte Ko-Rezeptorbestimmung mit Indikatorzellen (X4R5) indirekte Bestimmung über MT2-Zellen nach Synzytienbildung (SINI)	trainiert mit SVM Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung (SAAC) mit BLAST-Search
Ergebnis	FPR (false positive rate) [28]: > 15% = R5-Viren 5-15% = R5X4-Viren < 5% = X4-Viren	Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von X4-Viren bei >50%	PSSM score [29]: >(- 2,88) = R5-Viren (-2,88) – (-6,96) = R5X4-Viren < (-6,96) = X4-Viren	SVM score [30]: < 0,3 = R5-Viren > 0,3 = X4-Viren
Anmerkungen	1/3 der X4-Viren bei FPR 5% X4-Viren nicht erkannt [28] Bei Grenzfällen 11/25-Regel		PSSM _{X4R5} nur für Subtyp B PSSM _{SINI} für Subtyp B und C Bei Grenzfällen 11/25-Regel	

1.9 Antiretrovirale Therapie

Auf der Welt-AIDS Konferenz in Vancouver 1996 erschien der erste Bericht zur hoch aktiven antiretroviralen Therapie (High Active Antiretroviral Therapy (HAART)). Zwar wurden bereits Monotherapien mit Nukleosidanaloga Ende der 80er Jahre entwickelt, allerdings blieben diese weitgehend wirkungslos.

Der 1996 vorgestellte neue Therapieansatz sah die Kombination verschiedener Medikamente vor. Zunächst schloss dies nur diverse Nukleosidanaloga ein, aber mit dem Aufkommen neuer Therapeutika wie den Proteaseinhibitoren wurde das Spektrum erweitert.

2014 hatte jedoch nur zirka die Hälfte der mit HIV-infizierten Patienten (15,8 Mio, Stand Juni 2015) Zugang zu antiretroviraler Therapie (ART) [31].

Die klassischen Therapieansätze zielen vor allem auf die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease sowie Integrase ab. Neben diesen finden auch Eintritts-Inhibitoren Anwendung, die extrazellulär den Viruseintritt verhindern und so eine eventuell bessere Verträglichkeit gewährleisten [11].

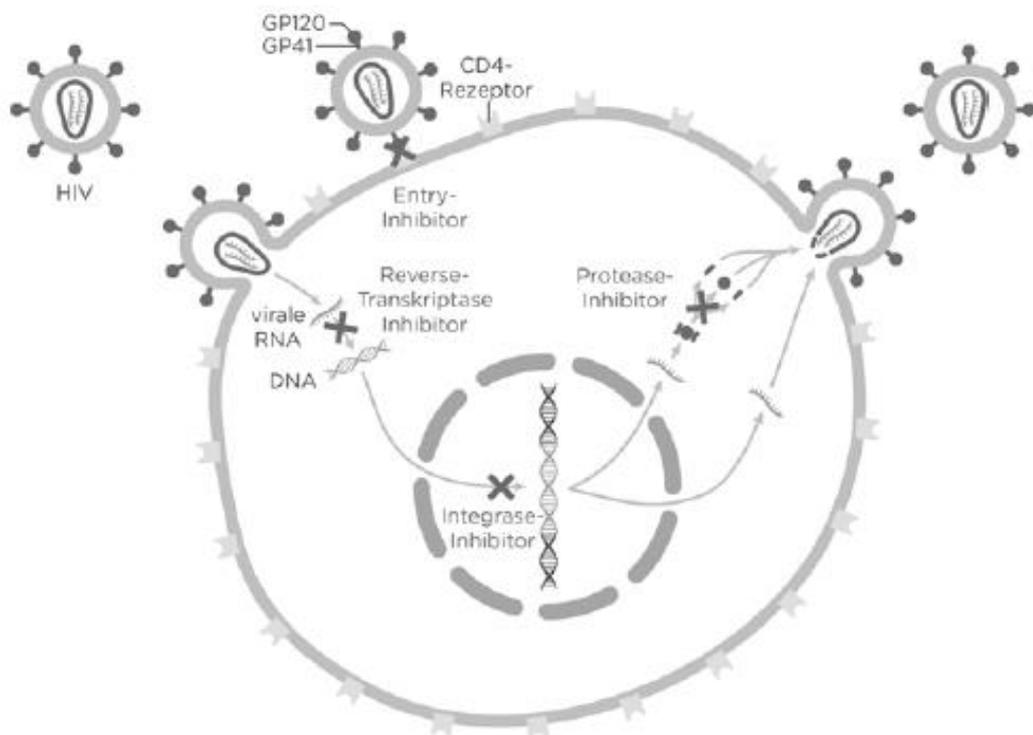


Abbildung 7 Angriffspunkte Antiretroviraler Therapie (ART) bei HIV-1 [11]

Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) wurden bereits 1987 entwickelt. Sie richten sich gegen das virale Enzym Reverse Transkriptase, das die virale RNA in DNA umschreibt. Als Nukleosid-ähnliche Substanzen konkurrieren sie mit den physiologischen Nukleosiden um die Bindungsstellen am Enzym. Der Unterschied liegt lediglich in der Modifikation des Zuckermoleküls. Beim Einbau der Analoga führt dies

zum Abbruch der entstehenden DNA-Kette, da keine stabilen Phosphorbrücken für die Doppelstrangstabilisierung ausgebildet werden können. NRTI sind so genannte „Pro Drugs“, die zunächst in der Zelle durch Modifikationen aktiv werden. Dies wird durch eine schrittweise Phosphorylierung umgesetzt.

Eine zweite Wirkstoffklasse, die der **Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)**, richten sich ebenfalls gegen das Enzym Reverse Transkriptase. Sie binden jedoch nicht-kompetitiv in der Nähe der Substratbindungsstelle des Enzyms und beeinflussen so die katalytische Aktivität. Daraufhin können weniger Nukleoside gebunden werden, sodass die Polymerisation verlangsamt und die Virusreplikation gehemmt wird.

Mitte der 90er Jahre wurde schließlich eine dritte Wirkstoffgruppe vorgestellt. Die **Proteaseinhibitoren (PI)** hemmen die HIV-Protease am Ende des Replikationszyklus, welche das Polyprotein Gag-Pol in seine Untereinheiten aufspaltet. Dadurch wird die Bildung infektiöser Viruspartikel unterbunden. Die Medikamente wurden basierend auf der enzymatischen Struktur entwickelt, sodass die Substanzen unmittelbar das aktive Zentrum binden. Für eine optimale Pharmakokinetik mit einer gesteigerten Maximalkonzentration und Halbwertszeit ist es notwendig sogenannte Booster einzusetzen, die das gastrointestinale und hepatische Isoenzym 3A4 des Cytochrom P450-Enzymsystems hemmen.

Weitere wichtige antiretrovirale Therapeutika sind die **Integrase-Inhibitoren**. Der Integrationsmechanismus erfolgt in vier Schritten, die theoretisch gehemmt werden könnten:

Pyranodipyrimidine unterbinden beispielsweise die Bindung der Integrase an die virale DNA und somit die Bildung eines stabilen Präintegrasekomplexes. Die anschließende 3' Prozessierung, bei der an beiden Enden der viralen DNA 3' Hydroxylenden innerhalb des Präintegrasekomplexes erzeugt werden, könnten durch Prozessierungsinhibitoren gehemmt werden. Nach der Prozessierung erfolgt der Transport der viralen DNA in den Zellkern und die irreversible Bindung der Hydroxylgruppe der viralen DNA an die Phosphordiesterbindung der Wirts-DNA. Dieser Schritt ist Angriffspunkt für sogenannte Strangtransfer-Inhibitoren. Das resultierende Lücken-aufweisende Intermediat aus viraler und zellulärer DNA wird durch zelluläre Reparaturenzyme aufgefüllt. Der Prozess kann unter Einwirkung von Methylxanthinen gehemmt werden.

Bisher sind jedoch nur Strangtransfer-Inhibitoren zugelassen. Die virale Integrase besitzt kein humanes Äquivalent, sodass Nebenwirkungen selten sind.

Die letzte Wirkstoffklasse beinhaltet die **Entry-Inhibitoren**. Sie fungieren an verschiedenen Angriffspunkten:

Die Attachement-Inhibitoren verhindern die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle. Eine weitere Gruppe dieser Wirkstoffklasse sind die Ko-Rezeptorantagonisten. Bisher wurden jedoch nur Inhibitoren zugelassen, die effizient den CCR5-Rezeptor blockieren und so die Bindung des Virus an den Wirts-Ko-Rezeptor verhindern. Dieser Therapieansatz basiert auf der Entdeckung, dass Patienten mit einer homozygoten Deletion des CCR5-Gens nicht mit HIV infiziert werden können. Auch bei einer heterozygoten Deletion in diesem Genbereich ist der virale Replikationszyklus verlangsamt im Vergleich zu Patienten, die keine Deletion in dieser Genregion aufweisen. Die Entwicklung von Medikamenten, die effizient den CXCR4-Rezeptor binden und so die Progression von AIDS verhindern, erweist sich hingegen als schwierig, da der Rezeptor auch an der Mobilisierung von Stammzellen beteiligt ist. Bisher wurden daher keine CXCR4-Antagonisten zugelassen. Die Fusion des viralen Kapsids mit der Wirtszellmembran wird schließlich durch Fusions-Inhibitoren beeinflusst [11].

Ko-Rezeptorantagonisten ebenso wie Fusionsinhibitoren sind für die Therapie verfügbar.

2 Zielstellung

Zielzellen des HIV sind CD4-Rezeptor tragende Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems und CD4-tragende T-Helferzellen. Für den Viruseintritt in die Wirtszelle bindet das virale Hüllprotein gp120 an die hoch-konservierte Bindungsstelle des CD4-Rezeptors. Dies führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des gp120-Moleküls, bei der die variable Domäne V3 zur Zelloberfläche ausgerichtet wird und somit zur Bindung des Chemokin-Rezeptors CCR5 oder CXCR4 beiträgt. Entsprechend des Ko-Rezeptorgebrauchs sind sogenannte R5-, X4-Viren oder dualtrope (R5X4) Viren am Infektionsgeschehen beteiligt. In der frühen Infektionsphase werden überwiegend CCR5-tragende Immunzellen infiziert. Im weiteren Verlauf der Infektion entwickeln sich virale Quasispezies durch die stete Virusreplikation, sodass im späteren Infektionsstadium vermehrt X4- sowie dualtrope Viren vorkommen. Dieser Übergang ist häufig mit einer schnelleren Progression von AIDS assoziiert. Auf dieser Grundlage basiert die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese, dass in der frühen Infektionsphase keine oder selten X4-Viren auftreten. In diesem Zusammenhang war das Ziel dieser Arbeit das Potential der genotypischen Ko-Rezeptorvorhersage als Korrekturmöglichkeit von serologisch als „rezent“ klassifizierten HIV-Neudiagnosen in der HIV-Inzidenzsurveillance (InzSurvHIV) zu ermitteln, da der verwendete ELISA methodenbedingt häufig falsch-rezente Ergebnisse aufweist.

Hierzu soll zunächst der HIV-Ko-Rezeptorgebrauch in einem Evaluationspanel, das aus 108 kürzlich-infizierten Serokonvertern (Infektionsdauer < 155 Tage) besteht, anhand von V3-Sequenzen bestimmt werden. Basierend auf diesen Sequenzen sollen sechs verschiedene *in silico* Vorhersagemodelle für die Auswertung des Ko-Rezeptorgebrauches verglichen und die Hypothese belegt oder abgelehnt werden. Des Weiteren soll für die auf Filter getropften Serumproben (DSS) der InzSurvHIV Neudiagnosen eine *env*-PCR optimiert und anschließend für DSS eines Patientenpanels mit kürzlich-erworbenen (rezenten) und chronischen Infektionen aus dem Zeitraum von 15.10. bis 31.12.2014 angewandt werden. Die resultierenden PCR-Produkte, die nach Sanger sequenziert werden, werden schließlich *in silico* genotypisch hinsichtlich ihres Ko-Rezeptorgebrauches ausgewertet und anschließend der Anteil von X4- und R5-Viren in den kürzlich-erworbenen und chronisch klassifizierten Infektionen ermittelt. Die Möglichkeit einer Korrektur der serologisch falsch-rezent bestimmten Neudiagnosen soll diskutiert werden. Abschließend sollen die Ko-Rezeptorvorhersagen rezenter Infektionen aus Sanger Sequenzen mit denen aus NGS generierten Sequenzen (Illumina Plattform, unter Verwendung eines 10%igen cut-offs für minoritäre Virusvarianten) verglichen werden, um den Anteil potentiell nicht erfasster X4- und R5-troper Viren zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Proben

Proben	Hersteller
HTV-1B-Laborstamm	HIV-1 Isolat, das in H9-Zellen vermehrt wurde und als Konzentrationsstandard (6,0E+10 Kopien/ml) dient, Quantifizierung erfolgte in externen Labor
HIV-1 Negativplasma	Von 26 Einzelspenders des Deutschen Rotes Kreuzes (DRK)
Subtyp-Panel	5 Isolate der HIV-1-Subtypen A, C, G, D, AG aus der Arbeitsgruppe FG18

3.1.2 HIV-1 Subtyp-Referenzpanel (Virusisolate)

Für das Subtyp-Referenzpanel wurden fünf Virusisolate verschiedener Subtypen aus der Virusstocklösung der Arbeitsgruppe des Fachgebietes 18 verwendet. Es wurden nur Subtypen ausgewählt, die in Deutschland vermehrt auftreten. Die Virusstocklösungen werden bei -70°C gelagert.

Subtyp	Herkunft
A	WHO
AG	WHO
C	WHO
D	WHO
G	WHO
CRF02_AG	Nigeria

3.1.3 Patientenproben

Filtergetrocknete Serumproben (dried serum spots – DSS), die im Rahmen der Inzidenz Surveillance Studie im Zeitraum von 15.10. bis 31.12.2014 am RKI eingingen, wurden in der RKI Routine mittels eines serologischen Tests in rezente und chronische Infektionen unterschieden. Die viralen Genombereiche der Protease (PR) und Reversen Transkriptase (RT) aus den Proben rezent-infizierter Patienten sind bereits im Vorfeld mit Sanger Sequenzierung (2014) sequenziert wurden.

Serumproben chronisch-infizierter Patienten aus dem Zeitraum 2014 waren bereits Gegenstand einer früheren Masterarbeit, in der die virale RNA isoliert und die PR und RT-Region mit Sanger Sequenzierung analysiert wurden. Die RNA-Proben ebenso wie die Daten wurden für weitere Studien zur Verfügung gestellt.

Diese 240 Proben aus 2014 (85 rezente, 155 chronische Infektionen) stellten das Studienpanel dieser Arbeit dar. Für die Validierung wurden zusätzlich 108 Proben von rezenten Serokonvertoren aus dem Zeitraum 1999 – 2012 als Evaluationspanel herangezogen. Die Sequenzen für die *env*-Genomregion stammen aus einer semi-nested-PCR und wurden für die Analyse bereitgestellt.

3.1.4 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
6xLoading Dye	Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen AG, Karlsruhe, Deutschland
100 mM dNTP-Set	Invitrogen AG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol ROTIPURAN® (99,8%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

3.1.5 Enzyme

Enzyme	Hersteller
RNasin	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
SuperScript® II Reverse Transkriptase	Invitrogen AG, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen AG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Primer

3.1.6.1.1 Reverse Transkription

Primer	Hersteller
Primer random p(dN) ₆	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Random Hexamer	metabion international AG, Planegg, Deutschland

3.1.6.1.2 PCR-Primer

Primer	Hersteller	Sequenz	Schmelz- temperatur T_M in °C ¹	Koordinaten
6537s	metabion international AG, Planegg, Deutschland	5'-AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA C-3'	54,0	6537 - 6562
5asc	metabion international AG, Planegg, Deutschland	5'-TCC TTS GAT GGG AGG GGC ATA CAT TGC-3'	63,0	7124 - 7151

3.1.6.1.3 Sequenzierungsprimer

Primer	Hersteller	Sequenz	Schmelz- temperatur T_M in °C	Koordinaten
6537s	s. oben	s. oben	s. oben	s. oben
5asc	s. oben	s. oben	s. oben	s. oben
2s	metabion international AG, Planegg, Deutschland	5'-TTA ATT GTG GAG GGG AAT TTT TCT-3'	58,0°C	6995 - 7023
2as	metabion international AG, Planegg, Deutschland	5'-AGA AAA ATT CCC CTC CAC AAT TAA-3'	58,0°C	6995 - 7023

¹ Ermittlung der Schmelztemperatur mit <http://www.metabion.com/biocalc/index.html>

3.1.7 Kommerzielle Kits

Kits	Hersteller
Agencourt AMPure XP – PCR Aufreinigung	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
NucliSENS® miniMAG®-Kit	bioMerieux, Marcy l'Etoile Frankreich
Quanti-iT™PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Thermo Scientific, St. Leon Rot, Deutschland

3.1.8 Marker

Marker	Hersteller
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
MassRuler DNA Ladder Mix ready-to- use	Fermentas - Thermo Scientific, St. Leon Rot, Deutschland

3.1.9 Geräte

Geräte	Hersteller
Thermoblock – Dry Block Heating Thermostat	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Geldokumentationsanlage Phase mit 12-bit Focus Kamera	Ges. f. Phorese, Analytik und Separation mbH, Lübeck, Deutschland
Kapillarelektrophorese Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Mastercycler proS	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NucliSENS® miniMAG®- Extraktor	bioMerieux, Marcy l'Etoile Frankreich

PCR-Tube- Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Süd-Laborbedarf GmbH, München, Deutschland
InfiniteF200 Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

3.1.10 Software

Software	Hersteller/Website
BioEdit 7.2.5	Tom Hall
COMET HIV-1	https://comet.lih.lu/index.php
DNASTAR-Lasergene, SeqMan Pro™, Version 10.0.1	DNASTAR
HIVcoPred	http://www.imtech.res.in/raghava/hivcopred/
IBM SPSS Statistics 20	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
FireCam Software	Ges. f. Phorese, Analytik und Separation mbH, Lübeck, Deutschland
Geno2pheno _[coreceptor]	http://coreceptor.geno2pheno.org/index.php
HIV Datenbank Los Alamos National Laboratory	http://www.hiv.lanl.gov/content/index
REGA HIV-1 Subtyping Tool Version 3.0	http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/
WebPSSM – Mullins Lab- University of Washington	https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion

Für die Extraktion wurden vier Serumdropsen der DSS (= 100µl) verwendet, von denen jeweils zwei in 1,8 ml Lysispuffer für 1 h bei 300 rpm und Raumtemperatur eluiert wurden. Anschließend wurde die RNA mit dem automatisierten Biomerieux EasyMag™ isoliert.

Nach der Lyse der viralen Hülle wurden die RNA-enthaltenen Lysate in speziell von Biomerieux gefertigte Reaktionsgefäße überführt und mit 100 µl in Lösung befindlicher Metallsilika vermischt.

Hierbei wurde die RNA an die Metallkügelchen gebunden. Die weiteren Schritte der RNA Isolation wurden entsprechend der Abbildung 8 durchgeführt.

Abschließend erfolgte außerhalb des Biomerieux Systems die Überführung der Proben in neue Reaktionsgefäße und die Lagerung bei -80°C.

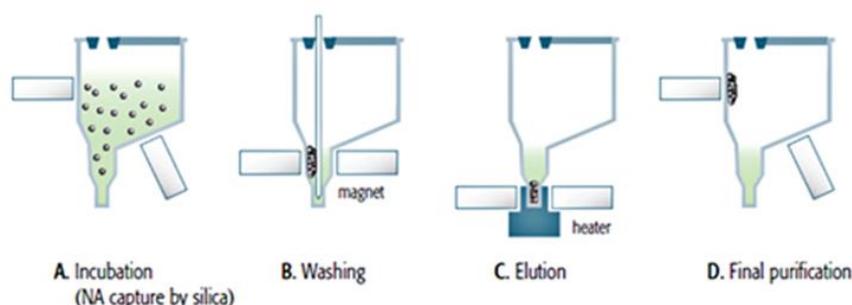


Abbildung 8 Prinzip der RNA-Extraktion mit dem Biomerieux NucliSense® easyMAG™

A) Die lysierten Proben wurden zunächst mit der Magnetsilika inkubiert und die Nukleinsäure (virale RNA) an die Metallkügelchen gebunden. B) Anschließend wurde die RNA in diversen Waschschrritten aufgereinigt. Hierbei interferierte die Magnetsilika mit einem Magneten. C) Nach Zugabe von 60 µl Elutionspuffer wurde das System erhitzt, um die RNA von der Silika zu eluieren (D). Schließlich erfolgte, ebenfalls magnetisch, die Separierung von den Metallkügelchen um das pure RNA-Eluat zu erhalten (4) [32].

3.2.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die extrahierte RNA wurde unter Einwirkung der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Enzym verfügt zudem über eine RNase H-Aktivität, welche die RNA entfernt, die nach der Transkription noch mit der der DNA hybridisiert ist.

Vor der eigentlichen Reaktion musste zunächst 10 µl der RNA für 3 min bei 65°C denaturiert werden. Anschließend wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit dem für die Reverse Transkription hergestellten Mix versetzt. Dieser Mix enthielt neben der RT, den RNase Inhibitor RNasin, sowie Puffer, Dithiothreitol (DTT), Desoxynukleosidtriphosphate

(dNTPs) und hexamere Randomprimer. Diese Komponenten wurden im Verhältnis wie in Tabelle 3 gezeigt gemischt und mit einem Volumen von 10 µl je Ansatz eingesetzt:

Tabelle 3 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription (RT)

Reagenz	Konzentration Stocklösung	Konzentration Arbeitslösung	µl/Ansatz
RT Puffer	5x	1x	4,0
dNTP	2,5 mM	0,5 mM	4,0
Random Hexamer-Primer	1200,0 µM	24,0 µM	0,4
DTT	100,0 mM	5,0 mM	1,0
RNasin	400,0 U/µl	20,0 U/µl	0,5
Reverse Transkriptase	200,0 U/µl	100,0 U/µl	0,5
Summe			10,0

Als Reverse Transkriptasen wurde im Rahmen der Optimierung die SuperScript II und SuperScript III (ThermoFisher scientific) verwendet. Diese unterscheiden sich insbesondere in ihrer Thermostabilität, da die SuperScript III bei 50°C eine wesentlich höhere Halbwertszeit besitzt als die SuperScript II. Zudem soll sie nach Herstellerangaben aufgrund einer geringeren RNase H Aktivität eine höhere cDNA-Ausbeute erzielen [33].

Die Reverse Transkription erfolgte im Thermozykler bei 42°C für eine Stunde. Anschließend wurde das Enzym 7 min bei 93°C inaktiviert und die cDNA im Zyklus bei 4°C bis zur PCR aufbewahrt.

Im Rahmen der Optimierung wurden die SuperScript II und III sowie zwei unterschiedlich konzentrierte Random-Hexamere-Primer (25 µM und 1200 µM) getestet.

3.2.3 Optimierung einer *env*-PCR

Für die Amplifikation des Genombereiches der viralen HIV-Hüllproteine (*env*-PCR) wurde bereits im HIV-Studienlabor ein semi-nested PCR-System für die Genomregion gp120C2V5 verwendet. Auf Grundlage des bestehenden PCR Protokolls wurde bereits eine „stand alone PCR“ für Plasmaproben etabliert (Tab. 4, 5). Aus dem daraus hervorgehende Protokoll sollte die PCR für DSS mit dem Primerpaaren der „inneren“ semi-nested PCR (Forward 6537s + Reverse 5asc, Fragmentlänge 614 bp) optimiert werden, da die Primer der „äußeren“ semi-nested PCR ein größeres PCR-Fragment erzeugen.

Tabelle 4 Mastermix für bereits etablierte env-PCR für Plasma-Proben

Reagenz	Konz. Stocklg	Konz. Final	µl/ Ansatz
PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂	10x	1x	2,5
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	2,0
Primer 6537s	25,0 µM	0,5 µM	0,5
Primer 5asc	25,0 µM	0,5 µM	0,5
Expand High Fidelity Polymerase	3,5 U/µl	2,6 U/µl	0,4
H ₂ O			13,9
Summe			20,0

20 µl Mastermix wurden mit 5 µl cDNA vermischt.

Tabelle 5 Zyklenprogramm für die etablierte env-PCR-Proben

Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
94,0	2,0	
94,0	0,3	
65,0	0,5	x 45
72,0	0,8	
72,0	7,0	
4,0	∞	
4,0	∞	

Die Optimierung der Methode erfolgte schrittweise unter Veränderung der Tabelle 6 dargestellten Reaktionsbedingungen.

Tabelle 6 Optimierungsschritte für die env -PCR

Optimierungsbedingung	Ausgangs- bedingung	Variationen	Verdünnung des Konzentrations- standards
1. Annealing-Temperatur (°C) (Primer TM +/- 5°C)	65,0	<u>Temperaturgradient</u> 53,0 – 66,0	6,0E+04
2. Elongationszeit (s)	45	45; 60	6,0E+04
3. cDNA Volumen (µl) (25 µl Ansatz)	5,0	2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0	6,0E+04 - 6,0E+02
4. Magnesiumchlorid- konzentration (mM)	1,5	1,5; 2,0; 3,0; 4,0	6,0E+04 - 6,0E+02

5. Primerkonzentration (symmetrisch) (μM)	0,5	0,3; 0,5; 0,6; 0,8; 0,9; 1,0; 1,3; 1,5	3,3E+03
6. Primerkonzentration (asymmetrisch) (μM)	0,5	0,6; 1,1; 1,6; 2,1	3,3E+03
7. Überprüfung Annealing-Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	65,0	<u>Temperaturgradient</u> 60,0 $^{\circ}\text{C}$ – 66,0 $^{\circ}\text{C}$	3,3E+03
8. Anzahl der Zyklen	45	45, 50, 55	3,3E+03

Die DNA-Stränge wurden zunächst bei 94,0 $^{\circ}\text{C}$ innerhalb von zwei Minuten denaturiert. Es folgten 45 Zyklen, in denen sich die Primer zunächst an den Template Strang komplementär anlagern (65,0 $^{\circ}\text{C}$, 15 s) und anschließend ausgehend vom 3'OH-Ende verlängert wurden (72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s). Daraufhin wurden die synthetisierten Stränge erneut bei 94,0 $^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 15 s denaturiert und der Zyklus begann von vorn.

Im letzten Schritt der PCR, der Extension, wurden unvollständig amplifizierte PCR-Fragmente bei 72,0 $^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 7 min vervollständigt.

Nach Abschluss der Optimierung soll die Nachweisgrenze für die in Deutschland prävalenten Subtypen (A, B, C, G, CRF02_AG) bestimmt werden. Die Subtypen der Referenzproben wurden im Vorfeld in der *pol*-PCR bestimmt. Die Nachweisgrenze ist definiert, als die letzte Verdünnung, bei der noch ein Signal detektierbar ist.

Anschließend wurde die Methode auf das Patienten-Panel angewandt unter dem Mitführen des HIV-1 B Standards 6,0E+04 Kopien/ml als Positivkontrolle sowie einer Negativkontrolle.

3.2.4 Qualitatives Agarose-Gel

Die Überprüfung der Spezifität der PCR erfolgte in einem 1%igem Agarosegel (1xTAE). 2 μl Probe wurde mit 3 μl Wasser und 1 μl 6-fach Ladepuffer versetzt. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (1kb DNA Ladder) sowie ein Konzentrationsstandard (Low Mass Ladder) mitgeführt, um später das Molekulargewicht beziehungsweise die Konzentration bestimmen zu können. Die Entscheidung für die optimale Reaktionsbedingung erfolgte anhand der Signalintensität des Konzentrationsstandards, welche die PCR-Ausbeute widerspiegelt.

Die Proben wurden im elektrischen Feld in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 90 V für 30 min aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung der in der DNA enthaltenen Phosphatgruppen wandern die Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode.

Um die Banden später sichtbar machen zu können, enthält das Gel den Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml). Dieser interkaliert in die DNA und verändert dabei sein Absorptionsspektrum, sodass die DNA unter UV-Anregung ein stärkeres Fluoreszenzsignal aussendet.

3.2.5 Aufreinigung

Für die nachfolgende Sequenzierung ist es notwendig PCR Produkte von Primern, dNTPs sowie von Salzen, zu befreien.

Hierfür wurden die PCR-Produkte mit dem Protokoll des Agencourt® AMPure XP Kit aufgereinigt. Die Technologie basiert auf dem „Solid Phase Reversible Immobilization“-Prinzip, bei dem ebenfalls Magnetkügelchen verwendet werden. 25 µl des PCR-Produktes werden mit 36 µl der hinzugegebenen Magnetsilica vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte dann entsprechend dem in Abbildung 9 dargestellten Arbeitsablauf.

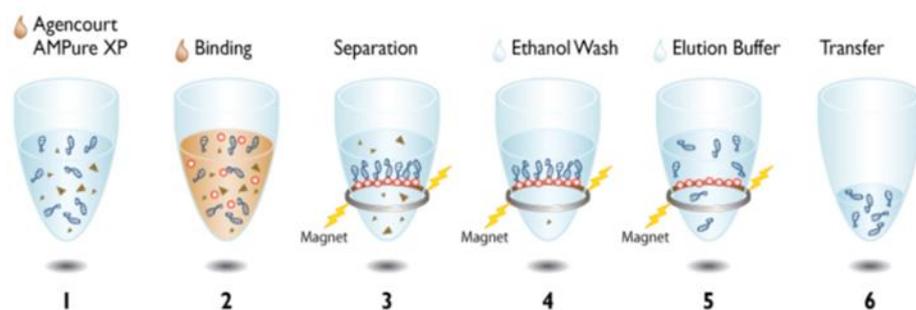


Abbildung 9 Prinzip Agencourt AMPure XP Aufreinigung

Die aufzureinigten PCR-Produkte wurden mit der Agencourt AMPure XP Magnetsilica versetzt (1). Diese Metallkügelchen binden nun die Nucleinsäuren (2). Über einen Magneten erfolgte die Separierung an der Silica gebundenen DNA und dem Überstand, in dem sich dNTPs, Salze sowie Primer aus der vorherigen PCR befanden und die nun entfernt werden sollten (3). Es schloß sich ein Ethanolwaschschritt an (4). Anschließend konnte die DNA eluiert und in neue Reaktionsgefäße transferiert werden. Die Magnetsilica wurde hierbei durch den Magneten zurückgehalten (5,6) [34]

3.2.6 Quantifizierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden photometrisch nach dem Protokoll des QuantiT™ PicoGreen®-Kits quantifiziert:

Zunächst erfolgte die Verdünnung der Proben: Hierfür wurden 100 µl Probe mit einfachem Tris-EDTA (TE)-Puffer in einem Verhältnis 1:50 in einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte, mit einem UV-undurchlässigen Folienboden, vermischt. Zusätzlich wurde bei jeder Messung eine Standardreihe mitgeführt, die ausgehend von einem Lambda-DNA-Standard (100 µg/ml) verdünnt wurde.

Für die Quantifizierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen verwendet. Dieser musste zunächst 1:200 mit TE-Puffer verdünnt werden. Anschließend wurden die Proben ebenso wie die Standardreihe und der Leerwert mit jeweils 100 µl PicoGreen vermischt. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte am Tecan InfiniteF200-Reader.

3.2.7 Sanger-Sequenzierung

1977 wurde erstmals von Frederick Sanger die Kettenabbruchreaktion für die Sequenzierung der DNA beschrieben. Die Reaktion ähnelt einer einfachen PCR. Allerdings wird in jedem Zyklusschritt, während der Polymerisation, ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) am 3' Ende des entstehenden DNA-Stranges eingefügt. Da ddNTPs über kein 3'OH-Gruppe verfügen, führt dies zum Abbruch der Amplifikation.

Die Reaktion durchläuft mehrere Zyklen, sodass schließlich unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Für die Auswertung werden die Proben in einer Polyacrylamid-Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die einzelnen DNA-Fragmente wandern hierbei aufgrund ihrer Ladung zur Anode. Nach der Auftrennung werden die an den Enden befindlichen Fluoreszenz-markierten ddNTPs durch einen Laser angeregt. Je nach Nukleotid wird ein anderes Farbsignal emittiert. Daraus kann schließlich die Basenfolge abgeleitet werden.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye Terminator 3.1 Mix von ABI unter der Verwendung von vier *env*-Primern (s. Material 3.1.6).

Daraus ergaben sich für jede Probe vier Ansätze. Die DNA sollte in einer Konzentration von 25 ng eingesetzt werden. Anschließend wurde der Mastermix, bestehend aus 5-fach ABI-Sequenzierungspuffer, dem Farbstoff BigDye sowie einer der vier Primer, hinzupipettiert. Daraus ergab sich ein 10,0 µl Ansatz.

Schließlich folgte die Amplifikation im Eppendorf Master Cycler S nach dem in Tabelle 7 gezeigten Zyklenprogramm.

Tabelle 7 Zyklenprogramm Sanger Sequenzierung

Temperatur	Zeit (min)	Zyklen
96,0°C	2,0	
96,0°C	0,2	
55,0°C	0,1	x 25
60,0°C	4,0	
4,0°C	∞	

Die Sequenzreaktionen wurden dem RKI eigenen Sequenzierungslabor übergeben, in dem die Kapillarsequenzierung (Kapillarsequencer 3130xL Genetic Analyzer ABI) erfolgte.

Die resultierenden Elektropherogramme wurden als ABI-Dateien ausgegeben und konnten anschließend ausgewertet werden.

3.2.8 Auswertung von Sanger Sequenzen

Aus den vier resultierenden Elektropherogramme im ABI-Dateiformat konnte mit dem Programm SeqManPro. ein Contig erzeugt und die Sequenzen ausgewertet werden. Es resultierte schließlich eine Konsensussequenz, die als fasta-Datei gespeichert und für die Ko-Rezeptorvorhersage verwendet wurde.

3.2.9 Next generation sequencing (NGS)

Für die Sequenzierung der Hüllproteine des HI-Virus wurde die Next generation Sequencing Methode nach dem Illumina *sequencing-by-synthesis*-Prinzip verwendet (Abb. 10).

Template-DNA wird über ein Adaptermolekül an einer Glasfläche, der sogenannten Flow cell, fixiert. In der darauffolgenden Bridge-Amplifikation werden ausgehend von diesem Startmolekül Cluster generiert, die aus identischen DNA-Molekülen bestehen. Bei der Sequenzierung wird in jedem Zyklusschritt ein Fluoreszenz-markiertes Nukleotid an den komplementär zum Template entstehenden DNA-Strang angefügt (*sequencing-by-synthesis*). Bevor der nächste Zyklus beginnt, wird die fluorophore Terminatorgruppe von dem Nukleotid abgespalten. Dabei wird entsprechend der fluoreszenz-markierten Base ein Lichtsignal detektiert. Der Vorgang setzt sich in den darauffolgenden Zyklen fort [35].

Die Sequenzierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte mussten zunächst mit 1xTE-Puffer auf eine Konzentration von 5 ng/µl vorverdünnt werden. Die Endkonzentration sollte schließlich 0,2 ng/µl betragen. Von der Verdünnung wurden 5 µl für die Probenvorbereitung mit dem Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit verwendet.

In der anschließenden „tagmentation“ wurden die Amplikons in einer Transposomen-basierten Methode gleichzeitig fragmentiert und markiert. Es schloss sich eine 12-Zyklus PCR an, bei der weitere Markierungen der Amplikons erfolgten. Daraus resultierte eine DNA-Bibliothek, in der die DNA-Fragmente beidseitig mit den Sequenzierungsprimern sowie mit Indices für die Multiplexierung und Adaptermolekülen für die Immobilisierung flankiert waren.

Für eine effektive Sequenzierung ist es jedoch nötig die DNA-Bibliotheken von Primer, dNTPs sowie von Salzen aus der vorangegangenen PCR zu befreien. Hierfür erfolgte die Aufreinigung, wie bereits im Vorfeld, nach dem „Solid Phase Reversible Immobilization“-Verfahren. Währenddessen wurden die DNA-Fragmente auch der Größe nach selektiert. Primerdimere und zu kurze Fragmente wurden eliminiert. Die Aufreinigung nutzte die paramagnetischen AMPure XP Metallkügelchen, die in einem Verhältnis von 1:0,5 eingesetzt wurden.

Im darauffolgenden Normalisierungsschritt war es nötig die DNA-Bibliotheken auf eine vergleichbare Konzentration einzustellen. Schließlich wurden die in der PCR-erzeugten doppelsträngigen Produkte durch 0,1 M Natronlauge getrennt, sodass die DNA einzelsträngig vorlag. Durch die Vereinigung gleicher Volumina der normalisierten DNA-Bibliotheken entstand der sogenannte „Probenpool“. Die Ermittlung der mittleren Fragmentlänge und der Konzentration der gepoolten DNA-Bibliotheken erfolgte unter der Verwendung des High Sensitive DNA-Analysis Chip, auf dem die Länge der Fragmente bestimmt wird, und in einer quantitativen PCR, in der durch den ct-Wert die Konzentration im Vergleich zu einem Standard bekannter Größe und Konzentration berechnet wird.

Der Probenpool wurde schließlich auf 18 pmol verdünnt und mittels Illumina MiSeq sequenziert. Die resultierenden Daten wurden als fasta-Dateien ausgegeben, welche unter Linux ausgewertet wurden. Zur Überprüfung der Qualität der Sequenzen diente das Programm FastQC. Anschließend folgte die Vorprozessierung unter den Programmen Trimmomatic und Flash. In Trimmomatic wurden die Adaptermoleküle sowie die ersten 15 Nukleotide von den Sequenzen entfernt. Das sogenannte „Adapter-clipping“ ist notwendig, da bei kürzeren Fragmenten < 300 Basen Teile des Adapters mitsequenziert werden. Zudem sind die ersten Nukleotide unzuverlässig bezüglich der Basenfolge [36]. Unter dem Programm Flash wurden Sequenzpaare, welche eine

Überlappung zwischen 15 bis 300 Basen aufwies, zu einer Sequenz zusammengefasst [37].

Die Sequenzenden wurden schließlich in dem Programm Trimmomatic entsprechend der Basenqualität getrimmt ($\geq Q20$) und zu kurze Fragmente kleiner als 50 Basen ausgeschlossen.

Es folgte das Mappen der Sequenzen gegen eine Referenzsequenz in dem Programm Segminator II [38]. Hierbei wurde die Häufigkeit jeder gemappten Base an jeder einzelnen Position im Vergleich zu einer Referenzsequenz bestimmt. Das Auslesen von Populationssequenzen erfolgte schließlich in dem von der Arbeitsgruppe entwickelten Python Skript. Dieses Programm erzeugt aus dem Alignment eine Aminosäure- sowie eine Konsensus-Sequenz mit variablem Grenzwert für die reads pro Position unter der Berücksichtigung von Basenmischungen. Zudem wird bei der Auswertung ein Grenzwert festgelegt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Die Daten werden schließlich im fasta-Format ausgegeben und schließlich hinsichtlich des Ko-Rezeptorgebrauchs ausgewertet.

3.2.10 Auswertung der NGS-Sequenzen für den Vergleich mit Sanger

Es wurden 81 Proben der Patienten mit kürzlich-erworbenen Infektionen aus 2014 mit NGS sequenziert. Für einen direkten Vergleich mit der Sanger-Sequenzierung diente ein NGS Grenzwert von 20%. Um Minoritäten zu detektieren, die mit dem 20% Grenzwert nicht erfasst wurden, wurde eine Analyse mit einem 10%-Grenzwert angeschlossen.

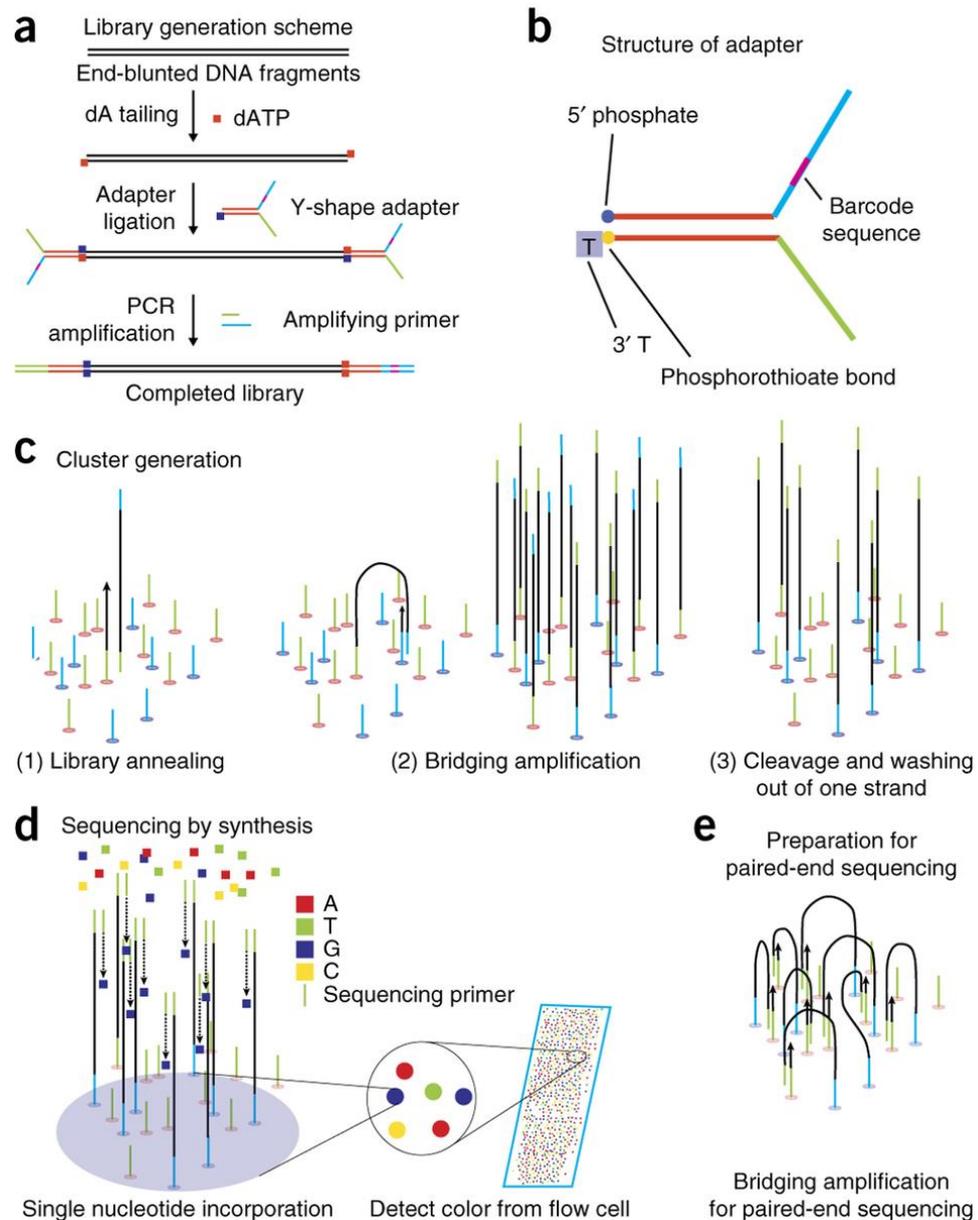


Abbildung 10 Prinzip des Next Generation Sequencing (NGS) [39]

Für NGS wird zunächst eine cDNA-Bibliothek generiert, welche aus doppelsträngiger cDNA besteht und an deren Enden ein Adaptermolekül ligiert wird (a). Dafür wird an die cDNA dA an die Enden gebunden. Der Adapter weist hingegen an seinem 3' Ende ein pT auf (b). Darauf basierend erfolgt die Ligation des Adapters an das cDNA-Fragment durch A-T-Paarung. Nach der Generierung der cDNA-Bibliothek wird diese über den Adapter an die sogenannte *flow cell* gebunden (c.1.). Es folgt die Bridge Amplifikation, in der ausgehend von einem template, ein Cluster erzeugt wird (c.2.). Unter Einwirkung von Natronlauge werden schließlich Einzelstränge erzeugt (c.3.). Nachdem diese ausreichend gewaschen wurden, erfolgt die Sequenzierung. Hierbei binden Sequenzierungsprimer an die template DNA. In jedem Zyklusschritt wird nun ein fluoreszenz-markiertes Nukleotid komplementär an den template Strang gebunden. Durch einen Laser wird das für jede Base spezifische Fluorophor angeregt und das Lichtsignal detektiert. Nach der Detektion wird die fluorophore Terminatorgruppe von dem Nukleotid abgespalten und der Zyklus beginnt von vorn (d). Mit Abschluss der Sequenzierung des ersten Stranges wird dieser entfernt und mit dem komplementären Strang der Vorgang wiederholt (e).

3.2.11 HIV-Subtypanalyse

3.2.11.1 Subtyp-Panel

Die *env*-PCR wurde mit dem Referenzstamm HIV-1B optimiert und die Nachweisgrenze bei $1,0E+02$ Kopien/ml für den Subtyp B in DSS nachgewiesen.

Um feststellen zu können wie sensitiv die *env*-PCR für andere Subtypen ist, wurden Virusisolate der Subtypen A, C, G, D und CRF02_AG herangezogen.

Von jedem Virusstock wurde zunächst die Viruslast mit der TaqMan-RT-PCR bestimmt. Die Viruslast war bei den 5 Isolaten $> 1,0E+10$ Kopien/ml. Die Stocklösung wurde daraufhin auf $1,0E+06$ Kopien/ml eingestellt und in einer 1:10 Verdünnungsreihe mit unspezifischer Träger t-RNA aus *E. coli* bis zu $1,0E+01$ Kopien/ml verdünnt. Für jeden Subtypen wurden die Verdünnungsstufen $1,0E+06$ Kopien/ml bis $1,0E+01$ Kopien/ml in der *env*-PCR amplifiziert und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um die Vergleichbarkeit mit der HIV-1B Standardreihe zu gewährleisten.

3.2.11.2 Subtypbestimmung

Für die Auswertung des HIV-1 Subtyps wurden die Genomsegmente *pol* sowie *env* zunächst einzeln mit der REGA-Stanford HIV Resistenz- und der Comet-HIV-1 Datenbank analysiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Bei dem *env*-Fragment wurde zusätzlich der im geno2pheno_[coreceptor]original ermittelte Subtyp einbezogen. Aus den ermittelten Subtypen der verwendeten *in-silico*-Analysen wurde schließlich ein endgültiger Subtyp jeweils für die *pol* und die *env* Genomregion ermittelt. Es wurden CRFs als übereinstimmend gewertet, wenn die entsprechenden Subtypen in den untersuchten Genombereichen korrelierten.

Für Patientenproben, die keinem eindeutigen Subtyp zugeordnet werden konnten, wurde zusätzlich eine phylogenetische Analyse durchgeführt.

Die Klassifizierung erfolgte durch die Distanz-basierte-neighbour joining Methode unter dem Einbeziehen von Bootstrap-Werten $> 70\%$. Für die Berechnung wurde ein Panel von Subtyp-Referenzsequenzen von der Los Alamos HIV-Sequenzdatenbank verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung einer *env*-PCR

Die Optimierung der *env*-PCR erfolgt in zwei Schritten: der Reversen Transkription und der eigentlichen PCR. Es wurden die „inneren“ Primer der semi-nested PCR verwendet.

Für die Reverse Transkription wurden die beiden Reversen Transkriptasen SuperScript II und III und zwei unterschiedlich konzentrierte hexamere Randomprimer (mit 25 μ M (Metabion) und 1200 μ M (Roche)) verglichen (Abb. 11).

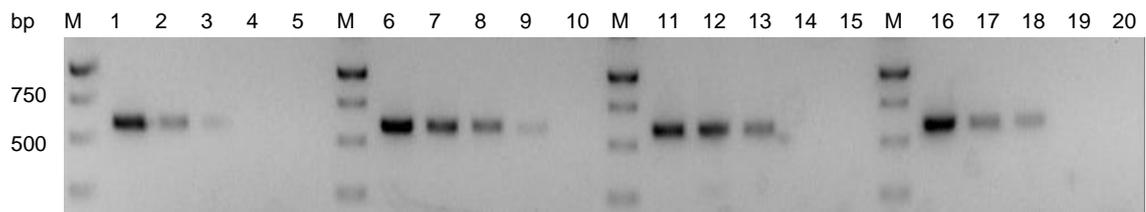


Abbildung 11 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten für die Optimierung der RT-PCR

Vergleich SuperScript II und III sowie unterschiedlich-konzentrierter hexamerer Randomprimer für die anhand der HIV-1B-Verdünnungen $6,0E+05$ bis $6,0E+01$ Kopien/ml

Bp: Basenpaare, M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung

Spur 1 - 5: SuperScript II und 25 μ M Randomprimer. Spur 6- 10: SuperScript II und 1200 μ M Randomprimer. Spur 11- 15: SuperScript III und 25 μ M Randomprimer. Spur 16- 20: SuperScript III und 1200 μ M Randomprimer

Die größte Sensitivität der PCR erwies sich bei der Verwendung der SuperScript II und des höher konzentrierten hexameren Randomprimer (1200 μ M) von Roche, da unter diesen Bedingungen ein Signal bei der HIV-1B-Verdünnung $6,0E+02$ Kopien/ml detektiert wurde.

Für die *env*-PCR ergab sich bei der Optimierung der Annealing-Temperatur mittels eines Temperaturgradienten im Bereich $53,0 - 66,0^{\circ}\text{C}$ am Eppendorf Cycler S die beste PCR-Ausbeute für die Temperatur $61,8^{\circ}\text{C}$ (s. Abb. 12).

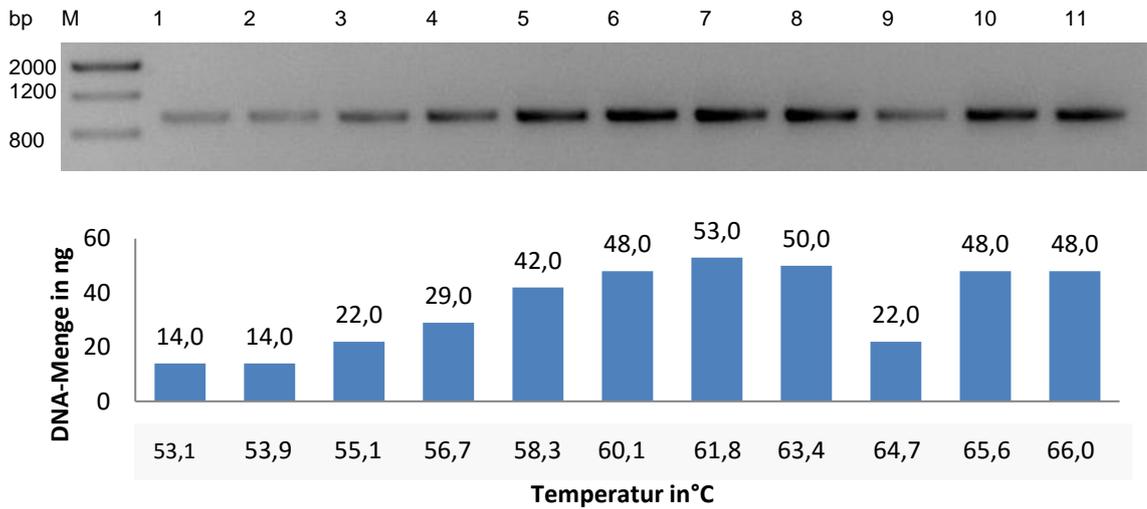


Abbildung 12 Agarose-Gel (1%) mit den PCR-Produkten der Temperaturgradienten-PCR

Ermittlung der Annealing-Temperatur anhand der HIV-1B-Verdünnung $6.0E+04$ Kopien/ml

Bp: Basenpaare, M: Low Mass Ladder (Fermentas) zur Größenbestimmung und Quantifizierung

Bei dem Vergleich zwei verschiedener Elongationszeiten (45 s; 60 s) konnte eine höhere PCR-Ausbeute bei einer 60 s Elongation erzielt werden.

Für die Optimierung des cDNA-Volumens unter Verwendung von 3,0 μ l, 4,0 μ l, 5,0 μ l und 6,0 μ l, ergab sich ein adäquates Ergebnis bei dem Einsatz von 5,0 μ l cDNA. (Abb. 13).

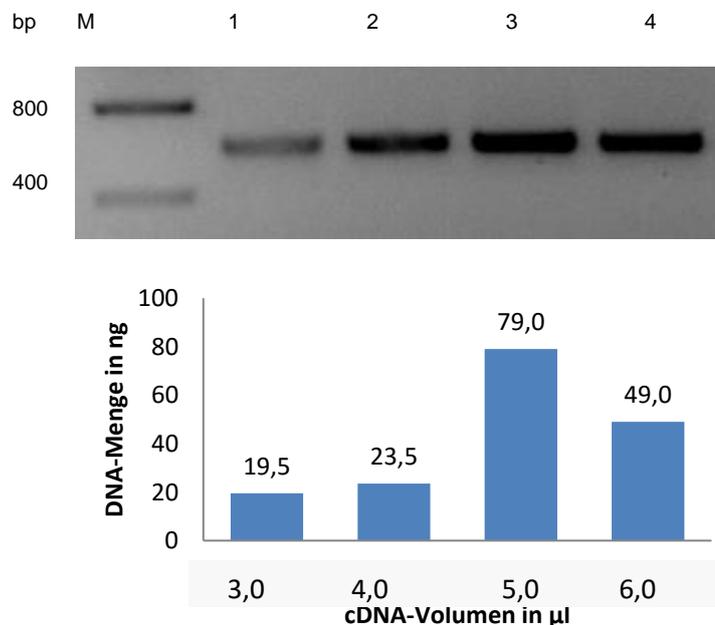


Abbildung 13 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten der cDNA-Volumensoptimierung

Verwendung der HIV-1B-Verdünnung $6,0E+04$ Kopien/ml

Bp: Basenpaare, M: Low Mass Ladder (Fermentas) zur Größenbestimmung und Quantifizierung

Bei der Gegenüberstellung der Magnesiumchloridkonzentrationen 1,5 mM; 2,0 mM; 3,00 mM und 4,0 mM erwies sich die höchste PCR-Ausbeute bei 1,5 mM (Abb.14)

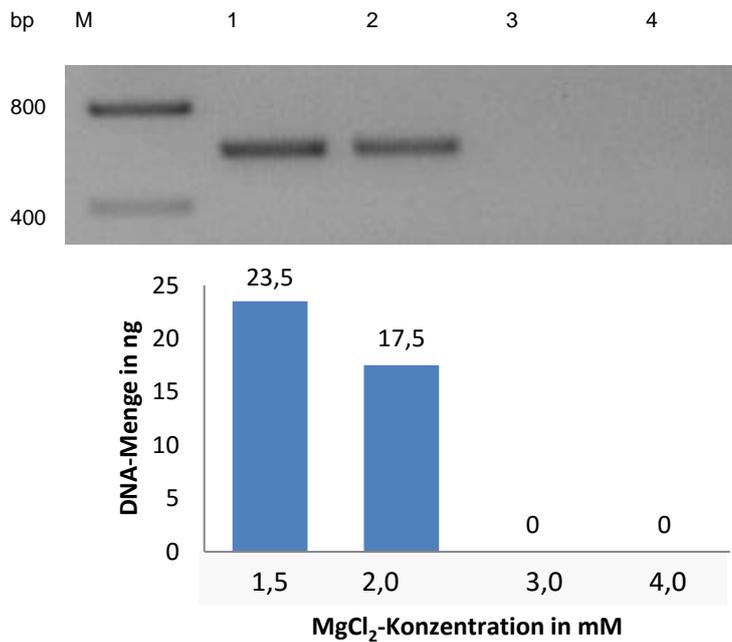


Abbildung 14 Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten der MgCl₂-Konzentrationsoptimierung

Verwendung der HIV-1B-Verdünnung 6,0E+03 Kopien/ml

Bp: Basenpaare, M: Low Mass Ladder (Fermentas) zur Größenbestimmung und Quantifizierung

Die darauffolgenden Optimierungsschritte erfolgten mit der HIV-1B-Verdünnung 3,3E+03 Kopien/ml, nah an der vermuteten Nachweisgrenze von 6,0E+02 Kopien/ml.

Die optimale Primerkonzentration wurde für 0,6 µM ermittelt (Abbildung 15). Der asymmetrische Primertest (Primerkonzentration: 0,6 µM; 1,2 µM; 1,8 µM; 2,4 µM) bestätigte das Ergebnis von 0,6 µM.

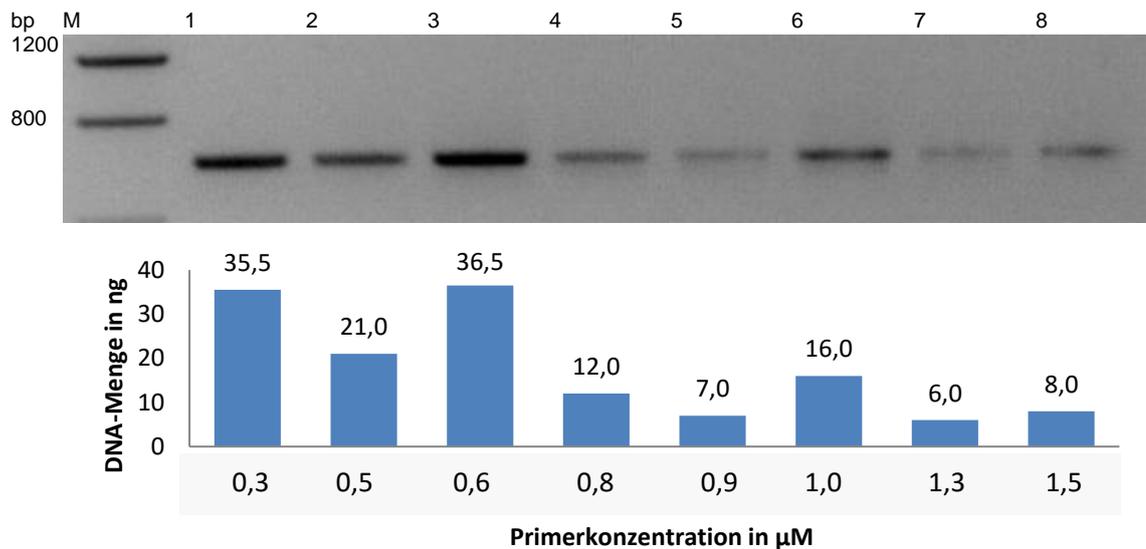


Abbildung 15 Agarose-Gelbild mit PCR-Ausbeuten des symmetrischen Primertests

Verwendung der HIV-1B-Verdünnung 3,3E+03 Kopien/ml

Bp: Basenpaare, M: Low Mass Ladder (Fermentas) zur Größenbestimmung und Quantifizierung

In einer abschließenden PCR-Reaktion zur Überprüfung der Annealing-Temperatur des angepassten PCR-Protokolls konnte anhand eines Temperaturgradienten zwischen 60,0°C und 66,0°C das Ergebnis von 61,8°C bestätigt werden (PCR-Ausbeute: 38,5 ng).

Die Erhöhung der Zyklenzahl von 45 auf 55 Zyklen resultierte in einer erneut gesteigerten PCR-Ausbeute, ohne dass Nebenbanden auftraten.

Unter Berücksichtigung aller veränderten Reaktionsbedingungen ergab sich das in den Tabellen 8 und 9 aufgeführte PCR-Protokoll.

Tabelle 8 Zusammensetzung des Mastermixes für die optimierte env -PCR

Reagenz	Konzentration	Konzentration	μl/Ansatz
	Stocklösung	Arbeitslösung	
Puffer mit MgCl ₂	10x	1x	2,5
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	2,0
Forward Primer (6537)	25,0 μM	0,6 μM	0,6
Reverse Primer (5asc)	25,0 μM	0,6 μM	0,6
Expand High Fidelity Polymerase	3,5 U/μl	2,6 U/μl	0,4
Nukleasefreies Wasser			13,9
Summe			20,0

Tabelle 9 Zyklenprogramm für die optimierte env-PCR

Temperatur	Zeit (min)	Zyklen
94,0°C	2,0	
94,0°C	0,3	
61,8°C	0,5	x 55
72,0°C	1,0	
72,0°C	7,0	
4,0°C	∞	

Anhand der Verdünnungsreihe des Referenzstammes HIV-1B konnte die Nachweisgrenze bei $6,0E+02$ Kopien/ml für die DSS ermittelt werden (Abb. 16). Dies entspricht der letzten Verdünnung bei der noch ein Signal detektierbar ist.

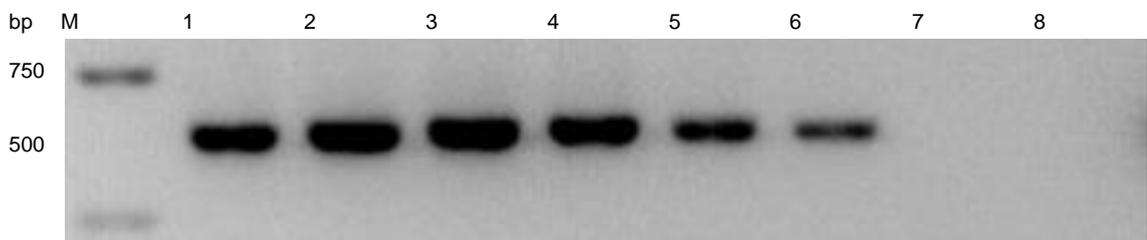


Abbildung 16 Agarose-Gel mit PCR-Produkten aus dem optimierten PCR-Protokoll

Verwendung der HIV-1 Verdünnungen $6,0E+07$ bis $6,0E+01$ Kopien/ml und der Negativkontrolle (von links nach rechts)

Bp: Basenpaare, M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung

4.2 Subtyp-generische Amplifikation der HIV-1 Subtypen

Für die Subtypen A; C; D; G und CRF02_AG ergaben sich die in Tabelle 10 aufgeführten Nachweisgrenzen.

Tabelle 10 Spezifität der env -PCR für die Subtypen A; CRF02_AG, C, D und G

Subtyp	Nachweisgrenze
A und CRF02_AG	$1,0E+04$
C	$1,0E+03$
D	$1,0E+05$
G	$1,0E+05$

4.3 Bestimmung des Subtyps und des Ko-Rezeptorgebrauches in einem Evaluationspanel

4.3.1 Patienteneigenschaften

Für die Evaluation wurden 108 Sequenzen von Serokonvertern mit rezenter HIV-Infektion aus dem Zeitraum 1998 – 2012 untersucht. Der Infektionszeitraum ist bei diesen Patienten bekannt. Dieser lag zwischen 0 – 92 Tagen - im Median bei 19 Tagen. Von den 108 untersuchten Proben waren 92,6% (n = 100) Männer und 5,6% Frauen. Von 2 Patienten war das Geschlecht unbekannt. 83,3% Patienten (90/108) stammten aus Deutschland. Im Median war das Alter 33 Jahre (106/108 im IQR: 29 – 39 Jahre). Die Übertragung der Infektion erfolgte nach den Angaben aus dem Meldebogen bei 81,5% (88/108) durch homosexuellen und 13,0% (14/108) durch heterosexuellen Kontakt. 0,9% (1/108) der Patienten infizierten sich durch intravenösen Drogenkonsum (IVD). Für 3,7% (5/108) der Patienten war der Transmissionsweg unbekannt. Der HIV-1 Subtyp B war am meisten prävalent (85,2%). Unter den Non-B Subtypen wurde der Subtyp A und die CRF02_AG (6,5%) sowie C (4,6%) am häufigsten nachgewiesen (Tab. 12, 13). Nur für 67 Patienten war das CDC-Infektionsstadium bekannt, von ihnen waren 95,5% im Stadium A der Infektion, 1,5% im Stadium B und 3,0% im C- Stadium. Die Viruslast betrug im Median $4,2E+05$ Kopien/ml (IQR $7,39E+04$ - $9,30E+05$ Kopien/ml). Für die CD4⁺-Zellzahl wurde ein Median von 438,5 Zellen/ μ l Blut (n = 107; IQR 436 – 694 Zellen/ μ l Blut) ermittelt.

Die soziodemographischen sowie klinischen Daten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Charakteristika der Serokonverter des Evaluationspanels (n=108)

	Anzahl n	in %
Zahl der Patienten	108	100,0
männlich	100	92,6
weiblich	6	5,6
unbekannt	2	1,9
Herkunftsland		
Deutschland	90	83,3
andere	18	16,7
Transmission		
MSM	88	81,5
Heterosexuell	14	13,0
IVDU	1	0,9
unbekannt	5	4,6

Subtyp		
B	92	85,2
Non-B	16	14,8
CDC (n=67)		
A	64	95,5
B	1	1,5
C	2	3,0
	Median	(min-max)
Viruslast (Kopien/ml)	4,2E+05	2,0E+03 – 5,0E+08
Alter (Jahren) n = 106	33,5	18-72
CD4 ⁺ -Zellen/ µl Blut n=107	436	84 - 1362
geschätzte Infektionsdauer (Tage)	12	0 - 91

4.3.2 Subtypenverteilung

Die Subtypbestimmung aus der *pol*- und der *env*-Genomregion stimmte zu 98% überein. Die Verteilung der Subtypen ist in Tabelle 12 dargestellt:

Tabelle 12 Subtypverteilung im Evaluationspanel für die *pol* und *env* Genomregion

Subtypen		Verteilung (n=108)	
<i>pol/env</i>	Summenwertung	n	%
A/A	A	1	0,9
B/B	B	92	85,2
C/C	C	5	4,6
D/D	D	1	0,9
G/G	G	1	0,9
CRF02_AG/A (AG)	CRF02_AG	6	5,6
CRF01_AE/B	URF	1	0,9
G (CRF02_AG)/B	URF	1	0,9

Zwei Proben der 108 Patienten des Evaluationspanels konnten keinem eindeutigen Subtyp zugeordnet werden. Sie werden daher in dieser Arbeit als Rekombinante (URF – unique recombinante forms) klassifiziert.

Die Rekombinante CRF02_AG wurde eindeutig zugeordnet. Sie wird unter Berücksichtigung der *pol*-Region entsprechend klassifiziert, aber unter der *env*-Genomregion meist als Subtyp A (CRF02_AG) angegeben. In dieser CRF ist im amplifizierten *pol*-Genombereich eine Rekombination des Subtyps A und G, aber am amplifizierten *env*-Fragment ist vorwiegend der Subtyp A vertreten (Abb. 17).

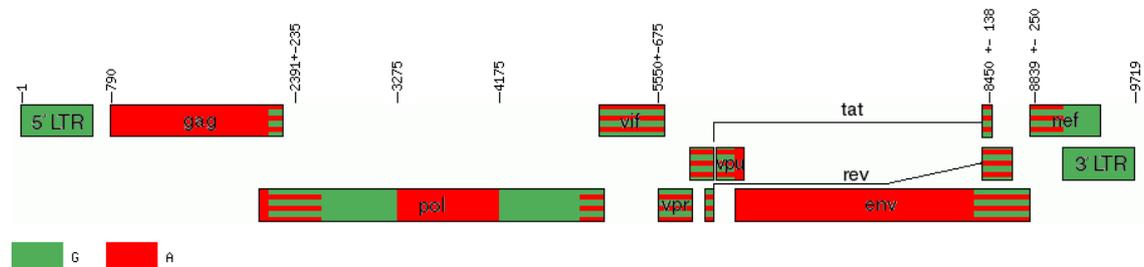


Abbildung 17 Subtyp CRF02_AG

Die graphische Darstellung der Subtypverteilung ist in Abbildung 18 aufgeführt.

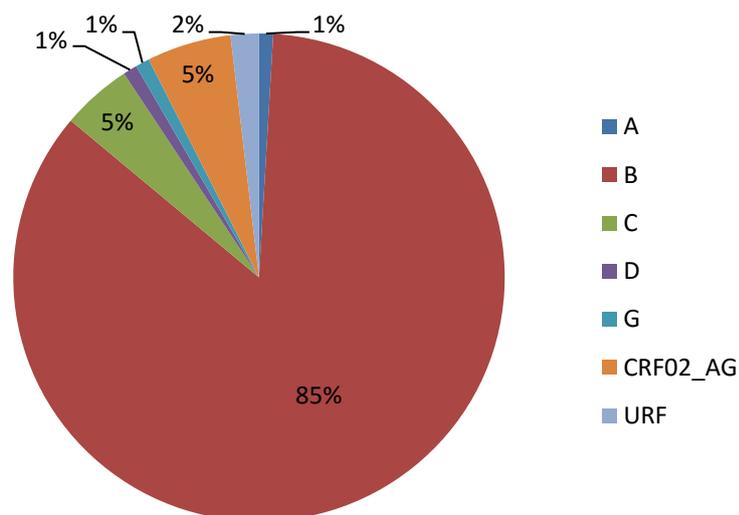


Abbildung 18 Verteilung der Subtypen innerhalb des Evaluationspanels

4.3.3 Vergleich verschiedener Ko-Rezeptorvorhersagemodelle

Unter Verwendung des geno2pheno_[coreceptor]-Originalalgorithmus (FPR < 5 = X4-Viren, 5 – 15 = R5X4-Viren, >15 = R5-Viren), konnten keine X4-Viren unter den 108 Patienten nachgewiesen werden, auch nicht nach Einbeziehen klinischer Parameter wie der Viruslast und der CD4⁺-Zellzahl.

Mit den beiden Phänotyp-basierten Berechnungsmodellen PSSM_{X4R5} und PSSM_{SINI} (< (-6,96) = X4-Viren, (-2,88) – (-6,96) = R5X4-Viren, >(- 2,88) =R5-Viren) konnte ebenfalls keine X4-Viruspopulation unter den Viren des Subtyps B und C nachgewiesen werden.

Dementsprechend konnte mit diesen drei Vorhersage-Algorithmen die Hypothese zu 100% (108/108 Proben) bestätigt werden.

Mit dem klassischen Vorhersagemodell, das die Nettoladung ($> 5 = X4$ -Viren, $< 4 = R5$ -Viren), und die 11/25-Regel (eine positive Aminosäure und Position 11 oder 25 = X4-Viren) einbezieht, wurden in 1/108 Patienten X4-Viren identifiziert. Dieser Patient wies eine Nettoladung von 5 und die positive Aminosäure Lysin an Position 25 auf. Klinisch wurde bei diesem Patienten eine Viruslast von $4,6E+06$ Kopien/ml und eine $CD4^+$ -Zellzahl von 392 Zellen/ μ l nachgewiesen. Die Infektion lag fünf Tage zurück. Das CDC-Stadium war jedoch unbekannt.

Der zweite $geno2phenoC_{-NGS-Sanger}$ -Algorithmus ($> 50\% = X4$ -Viren) identifizierte für die Infektion eines Patienten reine X4-Viren. Für die Viruslast wurden $1,2E+02$ Kopien/ml und eine $CD4^+$ -Zahl von 260 Zellen/ μ l detektiert. Die Infektionsdauer belief sich auf 84 Tage. Allerdings war auch für diesen Patienten das CDC-Stadium unbekannt.

Die Hypothese ließ sich demnach mit der 11/25-Regel in Verbindung mit der Nettoladung und dem $geno2phenoC_{-NGS-Sanger}$ -Algorithmus zu 99,1% bestätigen (107/108 Proben).

Der sechste verwendete Algorithmus HIVcoPred ($> 0,3 = X4$ -Viren, $< 0,3 = R5$ -Viren) klassifizierte für alle Patienten X4-virale Infektionen. Die Hypothese wird demnach zu 0% bekräftigt (Abb. 19, Anhang 11.1, Tab. 19).

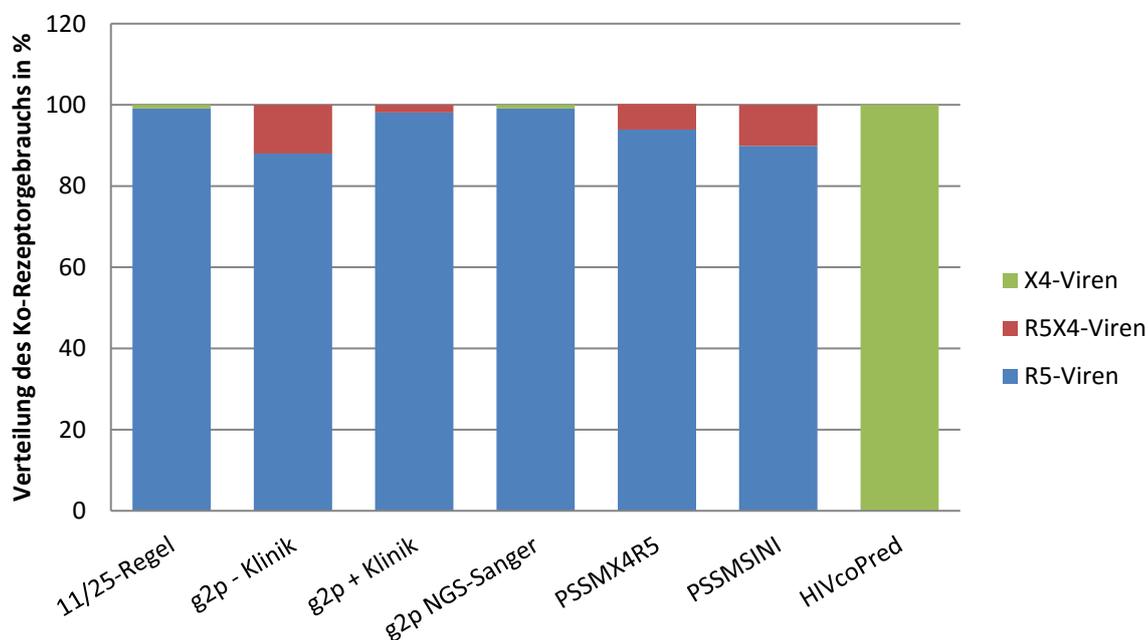


Abbildung 19 Vergleich verschiedener Ko-Rezeptor-Vorhersagemodelle

Die Vorhersagemodelle $geno2phenoC_{[coreceptor]}$ nach dem Originalalgorithmus mit aber auch ohne Einbeziehen klinischer Daten (+/- Klinik) sowie $PSSM_{X4R5}$ bzw. $PSSM_{SINI}$ bestätigen die Hypothese, dass keine reinen X4-Viren in der frühen Infektionsphase auftreten, zu 100% (108/108 Patienten). Mit $geno2phenoC_{-NGS-Sanger}$ und der 11/25-Regel in Verbindung mit der Nettoladung wird die Hypothese teilweise bestätigt (107/108 Patienten). Der Algorithmus HIVcoPred widerlegte die Hypothese vollständig (0/108 Patienten)

Da die Vorhersagemodelle $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$ original und $\text{PSSM}_{\text{X4R5}}$ bzw. $\text{PSSM}_{\text{SINI}}$ die Hypothese zu 100% bestätigen, können sie als Korrektur für serologisch als falsch rezent klassifizierte Infektionen herangezogen werden.

Die Patientenproben der InzSurvHIV-Studie (Oktober – Dezember 2014) wurden hinsichtlich des Ko-Rezeptorgebrauchs zur Identifizierung von reinen X4-Viruspopulationen und dem Nachweis serologisch falsch-rezent klassifizierter Infektionen mit dem $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$ -Originalalgorithmus ohne Einbeziehen der klinischen Daten ausgewertet, da die Verwendung dieses Algorithmus von verschiedenen Richtlinien [28, 29] empfohlen wird.

4.4 Vergleich des Ko-Rezeptorgebrauches in kürzlich-erworbenen und chronischen Infektionen aus Oktober bis Dezember 2014

Mittels eines BED-ELISAs wurden in der „InzSurvHIV“-Studie die Neudiagnosen des Probenpanels in kürzlich- (< 155 Tage) und chronisch-infiziert (> 155 Tage) eingestuft. Die entsprechend klassifizierten Patientengruppen wurden hinsichtlich des Auftretens von X4-Viren untersucht.

4.4.1 Charakteristika der rezent- und chronisch-infizierten Patienten

Von den 85 untersuchten Neudiagnosen mit einer rezenten Infektion waren 75 (88,2%) männlich. Die Patienten waren zwischen 21 und 83 Jahre - im Median 33 Jahre alt. 57,6% der Patienten stammte aus Deutschland und ebenso viele hatten sich auch in Deutschland infiziert. Der Subtyp B wurde unter Berücksichtigung der *pol*- und der *env*-Genomregion in 77,6% der Patienten klassifiziert. Nach eigenen Angaben erfolgte die Transmission bei 58,8% durch MSM. 11,8% infizierten sich durch heterosexuellen Kontakt und 2% durch intravenösen Drogenkonsum. Das CDC Stadium war nur für 46/85 Patienten bekannt, von diesen wiesen 71,7% das Stadium A auf, 15,2% das Stadium B und 13,0 das Stadium C. Die Viruslast war in der Gruppe der rezent Infizierten im Median $3,6\text{E}+05$ Kopien/ml (IQR $4,6\text{E}+04$ - $1,0\text{E}+06$ Kopien/ml). Die CD4⁺-Zahl war nur für 24 Patienten bekannt. Der Median betrug 489 Zellen/ μl (386 – 536 Zellen/ μl) (Tab. 14).

Unter den 155 chronisch Infizierten waren 76,8% Männer und 23,2% Frauen. Sie waren im Median 37 Jahre alt (IQR: 12- 75 Jahre). 54,2% der 155 Patienten stammten aus Deutschland, 29% waren nicht deutscher Herkunft und für 16,8% war das Herkunftsland nicht bekannt. Der Subtyp B wurde am häufigsten nachgewiesen (65,8%). Unter den chronisch Infizierten waren weniger MSM (41,3%) vertreten verglichen mit den rezent-infizierten Patienten. Dagegen erfolgte die Transmission durch heterosexuellen Kontakt häufiger (23,2%). 3,2% der Patienten infizierten sich durch intravenösen Drogenkonsum

(IVDU) und einer der Patienten wurde perinatal infiziert (PPI). Für 93 der 155 Neudiagnosen war das CDC-Stadium bekannt. Dementsprechend waren 58,1% im A-Stadium der Infektion, 28% im B-Stadium und 14% im C-Stadium. Die Viruslast war im Median $7,3E+04$ Kopien/ml ($1,9E+04$ - $1,8E+05$ Kopien/ml). Nur für 42 Patienten erfolgte die Angabe der CD4⁺-Zahl. Sie belief sich auf einen Median von 220 Zellen/ μ l (55 – 454 Zellen/ μ l) (Tab.13).

Tabelle 13 Charakteristika der nach BED in rezent- und chronisch-infizierte Patienten

	rezent Infizierte		chronisch Infizierte	
	n	in %	n	in %
Anzahl der Patienten	85		155	
männlich	75	88,2	119	76,8
weiblich	10	11,8	36	23,2
Herkunftsland				
Deutschland	49	57,6	84	54,2
andere	19	22,4	45	29,0
unbekannt	17	20,0	26	16,8
Subtyp				
B	66	77,6	102	65,8
Non-B	19	22,4	53	34,2
Transmission				
MSM	50	58,8	64	41,3
Heterosexuell	10	11,8	36	23,2
IVDU	2	2,4	5	3,2
PPI	0	0,0	1	0,6
unbekannt	23	27,1	49	31,6
CDC	n = 46		n = 93	
A	33	71,7	54	58,1
B	7	15,2	26	28,0
C	6	13,0	13	14,0
CD4⁺ bekannt	24	28,2	42	27,1
	Median	(min-max)	Median	(min-max)
Viruslast (Kopien/ml)	3,6E+05	0 – 2,6E+08	7,3E+04	0 – 3,0E+06
Alter in Jahre	33	21 - 83	37	12-75
CD4 ⁺ -Zellen/ μ l Blut	489	28 - 835	220	5 - 700

4.4.2 Auswertung der Subtypenverteilung

4.4.2.1 Für die rezenten Patientenproben

In den 85 rezent-eingestuften Patienten war der Subtyp B am meisten prävalent. Am zweit-häufigsten wurde der Subtyp A und die CRF02_AG klassifiziert (gesamt: 10,6%). Mit dem Subtyp C waren 4,7% der Patienten infiziert. Neben CRF02_AG konnte eine zweite CRF eindeutig nachgewiesen werden: CRF12_BF. Alle anderen Kombinationen, die nicht eindeutig zuzuordnen werden konnten, wurden als URF bezeichnet (Tab. 14). Die resultierenden Subtypen aus den HIV-1 Genomregionen *pol* und *env* stimmten in 96,5% der untersuchten Proben überein. In zwei Proben konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Eine Zuordnung der Rekombinanten war auch mit der phylogenetischen Analyse nicht möglich (s. Anhang 11.2, Abb. 29,30).

Tabelle 14 Subtypenverteilung innerhalb der kürzlich erworbenen Infektionen

Subtypen		Verteilung (n = 85)	
<i>pol/env</i>	Summenwertung	n	%
A/A	A	5	5,9
B/B	B	66	77,6
C/C	C	4	4,7
D/D	D	1	1,2
F/F	F	1	1,2
G/G	G	1	1,2
CRF02_AG/A	CRF02_AG	4	4,7
CRF12_BF/F	CRF12_BF	1	1,2
D(19_cpx)/B	URF	1	1,2
CRF02_AG/B	URF	1	1,2

Daraus ergab sich die in Abbildung 20 graphisch dargestellte Subtypverteilung.

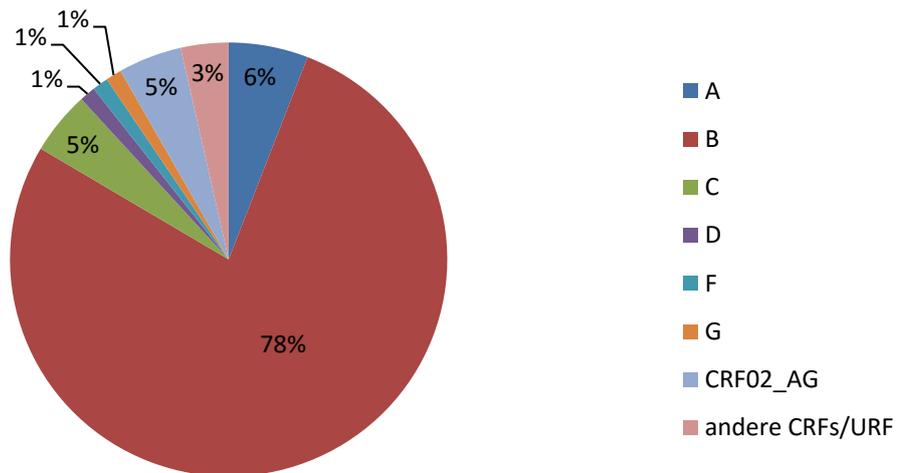


Abbildung 20 Subtypverteilung in dem Patientenpanel rezenter Infektionen

4.4.2.2 Für die chronisch-infizierten Patienten

Bei den chronisch-eingestuften Neudiagnosen war der Subtyp B in der Mehrheit der Proben nachgewiesen wurden. Subtyp A- und CRF02_AG-Infektionen lagen zu 16,2% vor. Mit dem Subtyp C infizierten sich 5,8% (Abb. 21; Anhang 11.2, Tab. 20). Fünf weitere CRFs wurden identifiziert (CRF01_AE, CRF20_BG, CRF32_06A1, CRF06_cpx, CRF29_BF). Die Ergebnisse aus der *pol* und der *env*-Subtypbestimmung wies in 96,1% der Proben eine Übereinstimmung auf. Sechs Proben waren nicht konkordant. Nach der phylogenetischen Analyse konnten zwei Proben Rekombinanten zugeordnet werden: CRF02_AG und CRF01_AE (s. Anhang 11.2, Abb. 29,30).

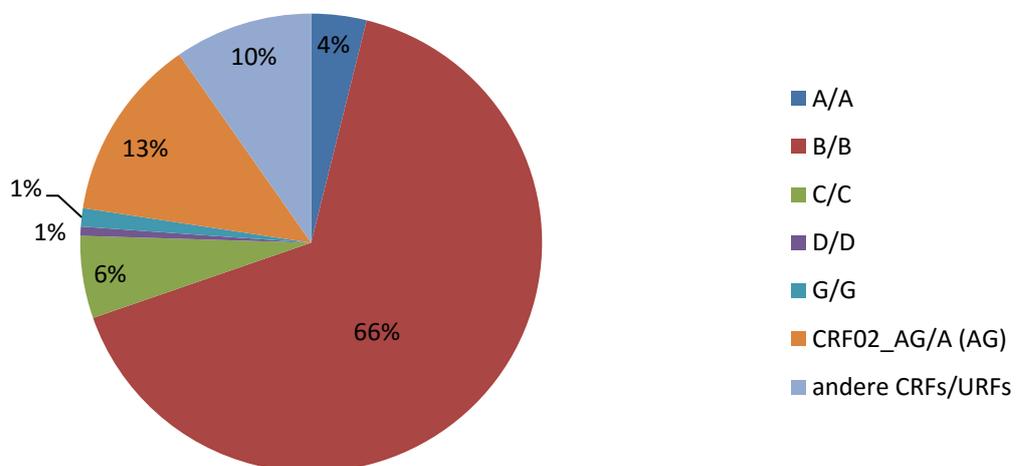


Abbildung 21 Verteilung der Subtypen unter den chronisch-infizierten Patienten

4.4.3 Auswertung des Ko-Rezeptorgebrauches

Mit dem originalen geno2pheno_[coreceptor]-Algorithmus (FPR < 5%) konnten in 5,9% der vom ELISA als rezent-ingestufteten Infektionen reine X4-Viren klassifiziert werden. In 10,6% der Neudiagnosen wurden dualtrophe Viren und in 83,5% reine R5-Viren (FPR > 15%) nachgewiesen.

In dem Proben-Panel, der vom ELISA chronisch-ingestufteten Infektionen wurden für 7,7% der Patienten reine X4-Viren und für 16,1% R5X4-Viren vorhergesagt. In 76,1% der Proben wurden reine R5-Viren nachgewiesen (Abb. 22, s. Anhang 11.2, Tab. 21).

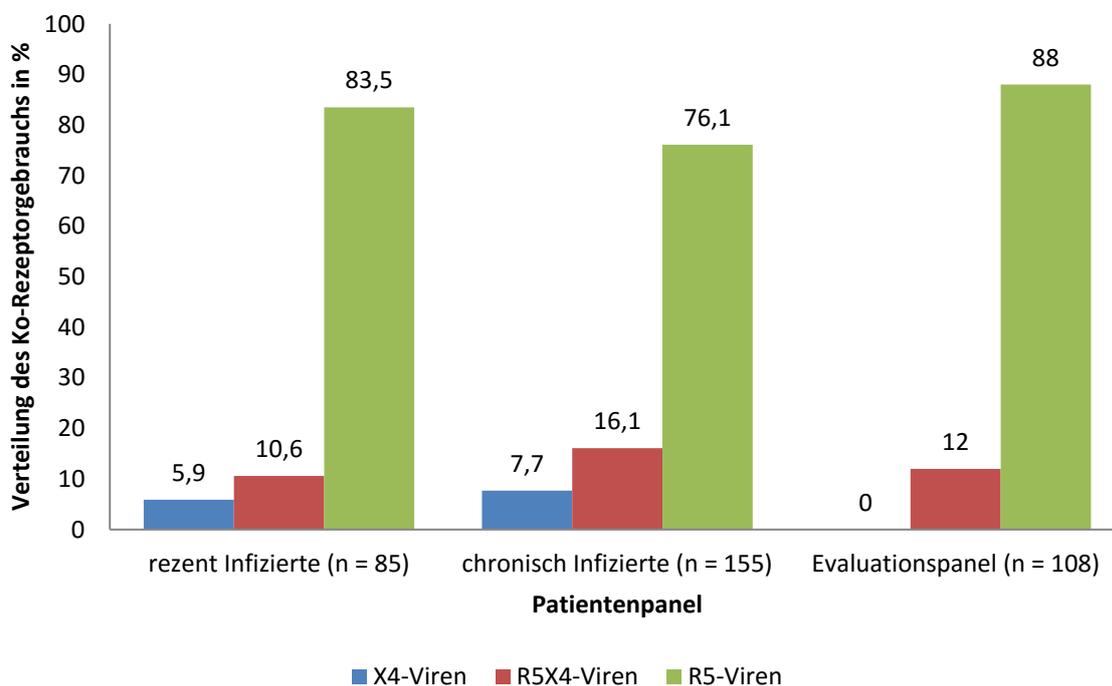


Abbildung 22 Verteilung X4/R5X4 und R5-Viren im Patienten- und Evaluationspanel

4.4.4 Charakteristika der mit X4-Viren infizierten Patienten mit rezenter und chronischer Infektion

Für die mit X4-Viren klassifizierten rezenten Infektionen war keine CD4⁺-Zellzahl bekannt. Nur bei zwei von fünf Patienten war das CDC-Stadium angegeben. Einer der Patienten war bereits im HIV-Stadium C und einer im Stadium B. Dies deutet zwar auf ein fortgeschrittenes HIV-Stadium und somit auf eine falsch rezente Klassifizierung hin, andererseits waren fünf Patienten mit R5-Virusinfektionen im Stadium C und sechs im Stadium B.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von X4-Viren und dem Herkunftsland sowie zum Transmissionsweg konnte nicht hergestellt werden, da es nur für zwei Patienten angegeben

war (Tab. 15). Demnach gibt es keine weiteren Hinweise auf eine chronische Infektion bei den Patienten, bei denen X4-Viren identifiziert wurden.

Tabelle 15 Charakteristika der rezent eingestuften Patienten mit X4-Viren

Tropismus	FPR (%)	Viruslast (Kopien/ml)	CD4⁺-Zahl (Zellen/ml)	Geschlecht	Herkunftsland	Transmission	CDC
X4	0,0	7,5E+04	unbekannt	w	unbekannt	unbekannt	unbekannt
	1,7	5,5E+05	unbekannt	m	W-EU	MSM	C
	2,4	2,5E+05	unbekannt	m	unbekannt	unbekannt	unbekannt
	3,7	4,3E+05	unbekannt	m	unbekannt	unbekannt	unbekannt
	4,0	8,5E+04	unbekannt	m	La	MSM	B

Unter den chronisch mit X4-Viren infizierten Patienten war nur für fünf von zwölf die CD4⁺-Zahl gegeben. Von acht Patienten war das CDC-Stadium bekannt. Vier von ihnen befanden sich im CDC-Stadium C und zwei im Stadium B. Für drei der im C-Stadium befindlichen Patienten war die CD4⁺-Zahl gegeben. Sie war bei allen < 200 Kopien/ml.

Wie in der Gruppe der rezent Infizierten waren die meisten Patienten männlich und stammten aus Deutschland. Ein Zusammenhang zwischen Transmissionsweg und dem Tropismus lässt sich nicht herstellen (Tab. 16).

Tabelle 16 Charakteristika der chronisch X4-viralen Infektionen

Tropismus	FPR (%)	Viruslast (Kopien/ml)	CD4⁺-Zahl (Zellen/ml)	Geschlecht	Herkunftsland	Transmission	CDC
X4	0,0	6,9E+05	unbekannt	m	D	MSM	A
	0,0	1,5E+05	352	m	D	MSM	B
	0,1	3,5E+05	11	w	D	unbekannt	C
	0,2	1,2E+03	unbekannt	m	D	unbekannt	A
	1,7	3,8E+04	unbekannt	w	UA	IDU	unbekannt
	2,1	1,3E+05	unbekannt	w	GUB	IDU	C
	2,2	2,8E+04	140	m	D	MSM	C
	3,2	2,2E+04	unbekannt	m	D	unbekannt	unbekannt
	3,7	2,9E+04	54	m	D	MSM	C
	4,4	5,0E+05	unbekannt	w	CZ	IDU	unbekannt
	4,8	1,3E+05	136	w	PL	unbekannt	B
5,0	7,9E+04	unbekannt	m	PL	unbekannt	unbekannt	

4.5 Vergleich der Ko-Rezeptorgebrauch-Vorhersage unter Verwendung von Sanger- und NGS-Sequenzen kürzlich-erworbener Infektionen

Bei dem direkten Vergleich von Sanger-Sequenzierung und NGS mit dem Grenzwert von 20% ergab sich eine ähnliche Verteilung des mit `geno2pheno[coreceptor]original` ermittelten Ko-Rezeptorgebrauchs. Nur ein Patient wurde mit NGS zusätzlich mit X4-Viren klassifiziert (FPR < 5%). Nach Sanger war der Patient mit dualtropen Viren infiziert. (Abb. 23, Anhang 11.5., Tab. 26).

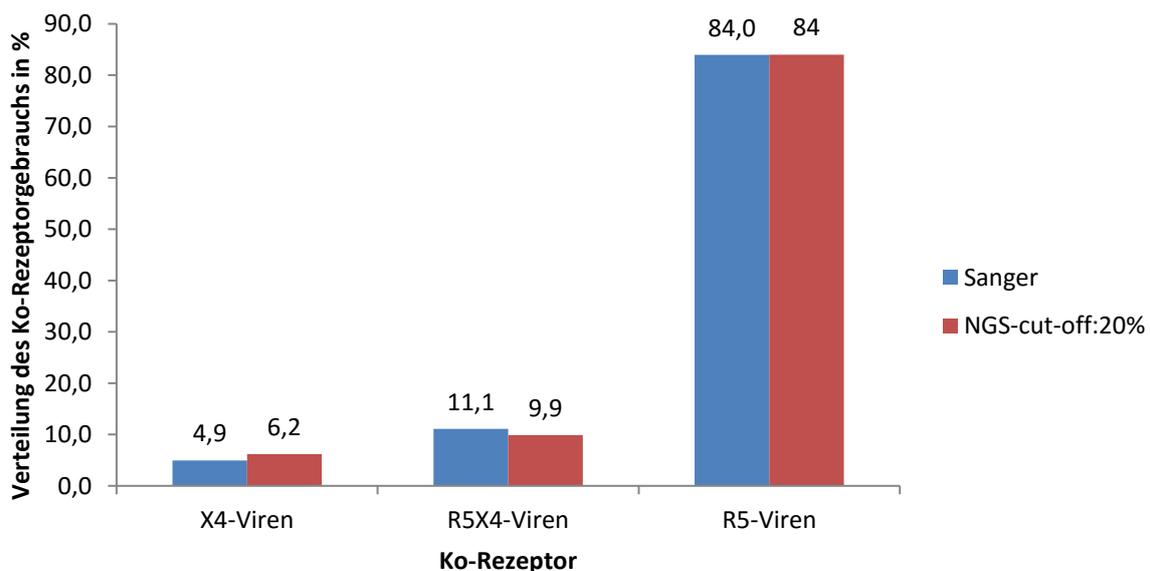


Abbildung 23 Vergleich Sanger-Sequenzierung mit dem NGS Grenzwert 20%

Mit dem niedrigeren Grenzwert von 10% zum Erfassen bisher nicht detektierter Minoritäten wurden keine weiteren X4-Virusinfektionen klassifiziert verglichen mit dem Grenzwert von 20%. Allerdings konnte eine dualtrophe Viruspopulation in einem anderen Patienten bestimmt werden, der mit Sanger und dem Grenzwert von 20% eine Infektion mit R5-Viren aufwies (Abb. 24).

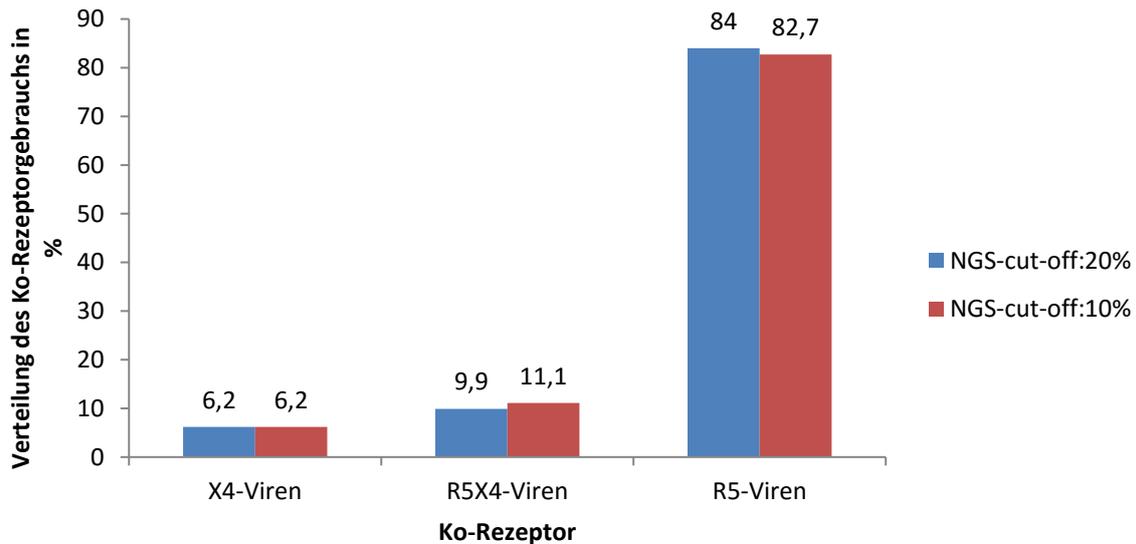


Abbildung 24 Vergleich der NGS Grenzwerte 10% und 20%

Bei einem direkten Vergleich der Sangersequenzierung und den NGS Grenzwerten 20% und 10% des nach NGS mit X4-Viren infizierten Patienten ist auffällig, dass die mit geno2pheno_[coreceptor]original bestimmte FPR von 7,9% (Sanger) zu 1,7% (NGS, Grenzwert 10%) abnimmt, während die Substitutionen innerhalb der V3-Sequenz zunimmt (Tab. 17, Anhang 11.5, Tab. 26).

Tabelle 17 Anzahl der Substitutionen und Ambiguitäten in der V3-Nukleotidsequenz

Vergleich Sanger-Sequenzierung und NGS (Grenzwert: 20%, 10%) anhand der in NGS klassifizierten X4-Viren

	Vergleich Sanger (FPR 7,9%) mit NGS cut-off 20% (FPR 2,6%)	Vergleich NGS cut-off 20% (FPR 2,6%) mit 10% (FPR 1,7%)
Anzahl Substitutionen	5	2
davon Ambiguitäten	5	2

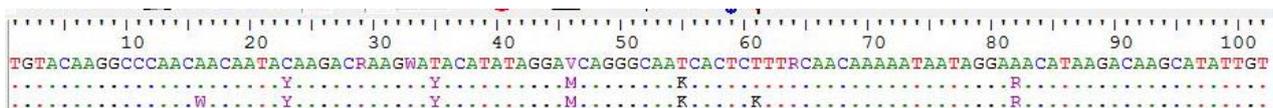


Abbildung 25 Nukleotidsequenzanalyse des V3-Loops der als X4 klassifizierten Viren

Vergleich der Sanger-Sequenz (oben) gegen die NGS-Sequenz mit 20% Grenzwert (Mitte) und 10% Grenzwert (unten)

Die Aminosäurezusammensetzung verändert sich im gleichen Umfang (Abb. 26).

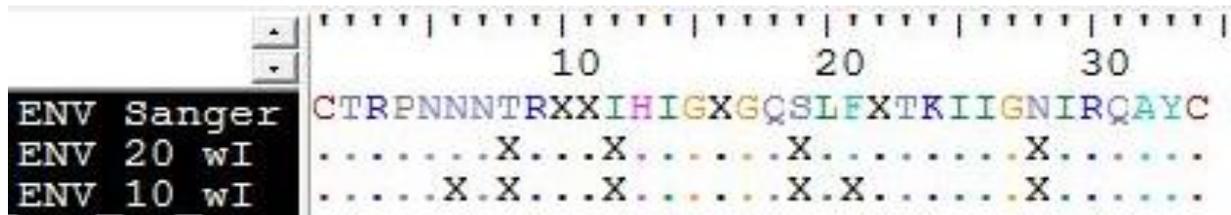


Abbildung 26 Aminosäuresequenzanalyse des V3-Loops der als X4 klassifizierten Viren

Vergleich der Sanger-Sequenz (oben) gegen die NGS-Sequenz mit 20% Grenzwert (Mitte) und 10% Grenzwert (unten)

Bei dem Patienten, der nach Sanger und mit dem NGS Grenzwert von 20% mit R5-Viren infiziert ist, wurde mit dem 10% NGS-Grenzwert eine Infektion mit dualtropen Viren klassifiziert. Die FPR sinkt von 88,8% (Sanger) auf 6,9% (NGS, Grenzwert: 10%). Die Anzahl der Substitutionen nimmt stärker zu bei dem Vergleich von Sanger und dem 20% Grenzwert als zwischen dem 10% und 20% Grenzwert.

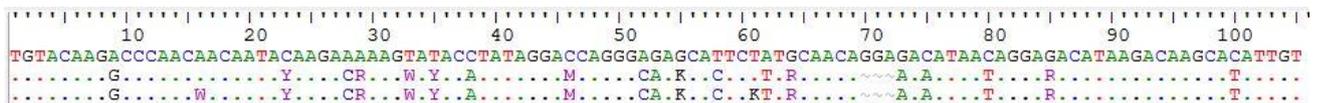


Abbildung 27 Nukleotidsequenzanalyse des V3-Loops der als dualtrop klassifizierten Viren

Vergleich der Sanger-Sequenz (oben) gegen die NGS-Sequenz mit 20% Grenzwert (Mitte) und 10% Grenzwert (unten)

Tabelle 18 Anzahl der Substitutionen und Ambiguitäten in der V3-Nukleotidsequenz

Vergleich Sanger-Sequenzierung und NGS (Grenzwert: 20%, 10%) anhand der in NGS klassifizierten X4-Viren

	Vergleich Sanger (FPR 88,8%) mit NGS cut- off 20% (FPR 56,1%)	Vergleich NGS cut-off 20% (FPR 56,1%) mit 10% (FPR 6,9%)
Anzahl Substitutionen	19	2
davon Ambiguitäten	8	2

In der Aminosäuresequenz zeigen sich ähnlich starke Unterschiede wie in der Nukleotidsequenz (Abb. 28)

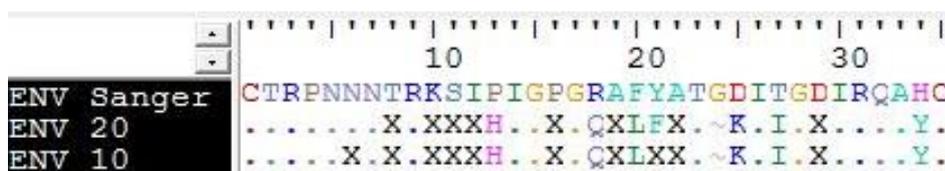


Abbildung 28 Aminosäuresequenzanalyse des V3-Loops der dualtrop-klassifizierten Viren

Vergleich der Sanger-Sequenz (oben) gegen die NGS-Sequenz mit 20% Grenzwert (Mitte) und 10% Grenzwert (unten)

5 Diskussion

Während der HIV-Infektion sind besonders in der frühen Phase R5-Viren präsent. Dies ist unabhängig vom Transmissionsweg und wird vor allem bedingt durch den Selektionsdruck der Schleimhautbarriere, aber vermutlich auch durch die humorale und zelluläre Immunantwort gegen X4-Viren [22].

Daraus ergab sich die Hypothese, dass bei Patienten, die sich in der akuten Phase der Infektion befinden, sich keine reine X4-Viruspopulation etabliert. Dies konnte für das Evaluationspanel mit akuten Infektionen mit den Vorhersage-Algorithmen `geno2pheno[coreceptor]original` sowie mit $PSSM_{X4R5}$ bzw. $PSSM_{SINI}$ zu 100% bestätigt werden.

Patienten der InzSurvHIV-Studie werden serologisch in kürzlich- (rezent) oder chronisch-infiziert klassifiziert. Der wahre Infektionszeitpunkt ist unbekannt. Mit dem Vorhersage-Algorithmus `geno2pheno[coreceptor]original` wurden neben R5- und R5X4- auch reine X4- Populationen unter den rezenten Infektionen identifiziert, was aufgrund der bestätigten Hypothese im Evaluationspanel auf eine serologisch falsch rezente Klassifizierung der Proben hindeuten könnte.

5.1 PCR-Optimierung

Aus einer bestehenden semi-nested PCR für die gp120C2V5 –Genomregion von HIV-1- wurde bereits eine einfache *env*-PCR für Plasmaproben etabliert. Darauf basierend erfolgte die Optimierung einer *env*-PCR für die in der Inzidenzstudie verwendeten Filterproben von Neudiagnosen (died serum spots – DSS). Hierfür wurde eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen ausgetestet, um die Effizienz der PCR zu erhöhen.

Die Reverse Transkriptase und der Randomprimer sind zentrale Reagenzien für eine effiziente Reverse Transkription (RT-PCR). Die Reaktion wurde mit den Enzymen SuperScript II und III in Kombination mit unterschiedlich-konzentrierten Randomprimern (25 µM Randomprimer (Metabion) und 1200 µM Randomprimer (Roche)) getestet. Die SuperScript III soll nach Herstellerangaben, aufgrund einer geringeren RNaseH-Aktivität, eine höhere cDNA-Ausbeute erzielen als die SuperScript II. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Auch mit einem niedrig-konzentrierten Randomprimer wurde keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt. Dementsprechend wurden die Ausgangsreaktionsbedingungen für die RT-PCR, wie in dem Protokoll für Plasmaproben beschrieben, beibehalten.

Für die Etablierung der *env*-PCR wurde das Primerpaar der „inneren“ semi-nested PCR ausgewählt, da virale RNA auf DSS durch den Transport bei Raumtemperatur degradiert und daher kleine Fragmente mit größeren Erfolg amplifiziert werden. Die Primerkonzentration wurde zunächst in einem Bereich von 0,3 – 1,5 µM variiert. Bei einer Konzentration von 0,6 µM

war die Signalintensität am stärksten. Dies wurde bei einer asymmetrischen PCR mit verschiedenen Primermengen bestätigt. Die Primerkonzentration wurde demnach in dem Protokoll für DSS um $0,1 \mu\text{M}$ erhöht verglichen mit dem Ausgangsprotokoll für Plasmaproben.

Für eine effiziente Amplifikation ist die Optimierung der Annealing-Temperatur relevant. Bei einer zu hohen Temperatur erfolgt keine stabile Hybridisierung der Primer, was in einer verminderten Amplifikation resultiert. Zu geringe Temperaturen führen hingegen zu einer geringeren Spezifität der Reaktion und zur Entstehung von Nebenprodukten.

Rechnerisch-ermittelte Schmelztemperaturen der Primer können häufig vom wahren Wert abweichen, um stattfindende Wechselwirkungen zwischen Primern und cDNA aufzuklären, wird eine Temperaturgradienten-PCR zunächst in groben und anschließend in feinen Abstufungen empfohlen [40]. Die Schmelztemperatur des forward Primers 6537 beträgt $58,0^\circ\text{C}$ und die des reversen Primers 5asc $63,0^\circ\text{C}$. In den meisten Laboren wird die optimale Annealing-Temperatur durch das Abziehen von $3,0 - 5,0^\circ\text{C}$ von der Primer-Schmelztemperatur berechnet [40]. Dementsprechend wurde der Temperaturgradient im ersten Schritt von $53,0^\circ\text{C}$ bis zu der im Ausgangsprotokoll angegebenen Temperatur von $65,0^\circ\text{C}$ eingestellt. Das stärkste Signal konnte bei $61,8^\circ\text{C}$ ermittelt werden. Mit dieser Temperatur wurde zunächst weiterverfahren. Der Wert liegt demnach $3,2^\circ\text{C}$ niedriger als im Ausgangsprotokoll ($65,0^\circ\text{C}$) angegeben. Allerdings konnte bei $65,6^\circ\text{C}$ und $66,0^\circ\text{C}$ ebenfalls eine hohe DNA-Menge amplifiziert werden. Dies zeigt, dass bei Verwendung des Primerpaars 6537/5asc mehrere Temperaturoptima auftreten, begünstigt durch die weitauseinanderliegenden Schmelztemperaturen der Primer.

Im abschließenden Optimierungsschritt, in dem die Annealing-Temperatur in feineren Abstufungen erneut überprüft wurde, konnte das Ergebnis von $61,8^\circ\text{C}$ bestätigt werden.

Die sich der Annealing-Phase anschließende Elongation wurde auf 60 s erhöht und somit um 15 s verlängert verglichen mit dem Ausgangsprotokoll für Plasmaproben. In dieser Elongationsphase der PCR werden unvollständige Amplifikate vervollständigt. Bei einer zu kurzen Zeit wird die DNA-Ausbeute vermindert, wohingegen eine zu lange Elongation zu Nebenprodukten führen kann oder zu einem früheren Versagen der Polymerase.

Die Erhöhung der Zyklenzahl von 45 auf 55 resultierte ebenfalls in einer größeren PCR-Produktmenge, ohne dass Nebenbanden auftraten.

Weitere Reaktionskomponenten wie das cDNA-Volumen und die Magnesiumchlorid-Konzentration wurden zudem überprüft. Die im PCR-Puffer eingestellte MgCl_2 -Konzentration von $1,5 \text{ mM}$, die auch im Ausgangsprotokoll verwendet wurde, konnte bestätigt werden. Auch das eingesetzte cDNA-Volumen von $5,0 \mu\text{l}$ wurde beibehalten.

5.2 Sensitivität der *env*-PCR für HIV-1

Die Nachweisgrenze für den in Deutschland stark prävalenten Subtyp B lag für DSS bei $6,0E+02$ Kopien/ml.

In Plasmaproben konnte mit dem Ausgangprotokoll der *env*-PCR bis zu einer Verdünnung von $6,0E+01$ Kopien/ml ein PCR-Produkt erzeugt werden.

Für DSS ist das eingesetzte Probenvolumen jedoch geringer als bei Plasmaproben. Zudem wird auch Material in den Filtern zurückgehalten, was die höhere Nachweisgrenze für DSS erklärt.

Die ebenfalls in Deutschland prävalenten Subtypen A, CRF02_AG, C, D und G wiesen in der PCR eine höhere Nachweisgrenze auf. Es ergaben sich Unterschiede von bis zu drei log-Stufen verglichen mit dem Subtyp B. Die Primerbindungsstellen ließen keine Unterschiede im relevanten 3'-Bereich des Los Alamos Subtyppanel erkennen, das für das Primerdesign verwendet wird.

Da die Sequenz im relevanten Primerbereich der verwendeten Subtypisolate nicht bekannt ist, ist es wahrscheinlich, dass die verminderte Sensitivität auf „Nucleotid-mismatche“ im Bereich der Primerbindungsstellen zurückzuführen ist.

In dem Patientenpanel mit rezenten und chronischen Infektionen lag die Viruslast für die Subtypen A, CRF02_AG, C und D oberhalb der Nachweisgrenze. Für den Subtyp G konnte auch bei einer Viruslast von $6,0E+03$ Kopien/ml ein *env*-Fragment amplifiziert werden, somit stellen die Nachweisgrenzen, welche mit den Isolaten ermittelt wurden, nur einen Richtwert dar.

5.3 Analyse des Ko-Rezeptorgebrauchs

5.3.1 Vergleich verschiedener bioinformatischer Vorhersage-Methoden anhand des Evaluationspanels

Aufgrund der Tatsache, dass der phänotypische Trofile®Tropismusassay als Gold-Standard für die Ko-Rezeptorvorhersage sehr kosten- und zeitintensiv ist, wurden in den letzten Jahren verschiedene bioinformatische Vorhersagemodelle implementiert. Grundlage bei diesen genotypischen Tropismusassays ist das virale V3-Loop im Envelope-Genombereich von HIV, das an der Interaktion mit dem Ko-Rezeptor beteiligt ist. Die Zunahme positiver Aminosäuren in der V3-Domäne trägt über die Zeit zum Übergang von R5 zu X4 bzw. R5X4-Viren bei. Die Untersuchung des Ko-Rezeptorgebrauchs erfolgte zunächst anhand eines Evaluationspanels bestehend aus rezenten Infektionen mit bekannten Infektionszeitpunkt. Die Hypothese, dass keine reinen X4-Viren in der frühen Infektionsphase auftreten, konnten seitens dieses Panels

mit PSSM und geno2pheno_[coreceptor]original mit aber auch ohne das Einbeziehen klinischer Parameter (FPR < 5%) zu 100% bestätigt werden.

Mit geno2pheno_{C_{NGS-Sanger}} und der 11/25-Regel in Verbindung mit der Nettoladung konnte die Hypothese nur zu 99,1% (107/108 Patienten) bestätigt werden. Beide Vorhersagemodelle klassifizierten für je einen Patienten eine X4-virale Infektion.

Der geno2pheno_{C_{NGS-Sanger}}-Algorithmus berechnete für einen Patienten eine 56%ige Wahrscheinlichkeit, dass X4-Viren am Infektionsgeschehen beteiligt sind. Dieser Wert ist nahe dem Grenzwert von 50%, sodass vermutlich eine dualtrope (R5X4)- oder eine Mischpopulation vorliegt, aber keine reine X4-Viruspopulation. Aus den klinischen Daten ist eine Viruslast von zirka 1,0E+05 Kopien/ml und eine CD4⁺-Zahl von 260 Zellen/ml zu entnehmen. Ob die Klassifizierung von X4-Viren durch geno2pheno_{C_{NGS-Sanger}} plausibel wäre, ist ohne die Angabe des CDC-Stadiums nicht möglich. Dualtrophen Viren können hingegen in jedem HIV-Stadium auftreten.

Die von Raymond et al. etablierte 11/25 Regel, die in Kombination mit der Nettoladung des V3-Loops zur Bestimmung des Wirtstropismus beiträgt, identifizierte ebenfalls für 1/108 untersuchten Patienten des Evaluationspanels eine reine X4-Viruspopulation. Dieser Patient wies an Position 25 die basische Aminosäure Lysin und eine berechnete Nettoladung nahe des Grenzwertes (> 5 = X4-Viren) auf. Die Viruslast belief sich auf 4,5E+06 Kopien/ml und die CD4-Zellzahl auf 391 Zellen/μl. Ohne die Angabe des CDC-Stadiums lässt sich auch für diesen Patienten nicht erklären, ob der Nachweis von X4-Viren plausibel wäre.

Der sechste verwendete Algorithmus HIVcoPred berechnete für alle 108 Patienten des Evaluationspanels Infektionen mit reinen X4-Viren. Diese hohe Sensitivität wurde bereits in anderen Publikationen wie der von Schreiber und Schwalbe bestätigt [15].

Für die Auswertung des Patientenpanels der kürzlich-erworbenen und chronischen Infektionen wurde der Original-geno2pheno_[coreceptor]-Algorithmus ohne Einbeziehen klinischer Parameter verwendet. Auf dieses Vorhersagemodell beziehen sich die Deutsch-Österreichischen [28] und Europäischen Richtlinien [29] sowie verschiedene Publikationen [24, 27, 41, 42, 43].

5.3.2 Anteil von X4-Viren bei rezenten und chronischen Infektionen anhand des Patientenpanels von 2014

X4-Viren sind nur selten am akuten Infektionsgeschehen beteiligt (bei therapie-naiven < 1%, bei therapierten Patienten < 5%) [44]. Nur in zirka 50% der Subtyp B Infektionen erfolgt tatsächlich der Übergang von R5- zu X4-Viren [22].

Nach dem in der Inzidenzstudie verwendeten serologischen Rezent-Test werden Infektionen als „chronisch“ klassifiziert, wenn der Infektionszeitpunkt länger als ca.155 Tage zurückliegt.

Eine fortgeschrittene Infektion kann ansonsten nur anhand des CDC-Stadiums (B oder C) oder der CD4⁺-Zellzahl (< 200 Zellen/ μ l) vermutet werden, sofern diese klinischen Daten bekannt sind.

Bei den kürzlich-erworbenen Infektionen der Inzidenzstudie konnten bei 5,9% reine X4-Viren mit geno2pheno_[coreceptor]Original (FPR < 5%) nachgewiesen werden. Der Anteil von X4-Viren war zwar geringer als in den chronischen Infektionen (7,7%), jedoch nicht signifikant ($p=0,79$). Bei den rezenten Infektionen wurden in 83,5% R5-Viren vorhergesagt, bei den chronischen 76,1%.

Das Auftreten von X4-Viren ist meist mit einer Abnahme der CD4⁺-Zahl und dem Anstieg der Viruslast assoziiert [11]. Ein Zusammenhang zum Wirtstropismus konnte in dieser Studie - ebenso wie in der Studie von Rieder et al - nicht aufgezeigt werden [41].

Das CDC-Stadium, das nur für wenige Patienten angegeben war, identifizierte für einen der rezent-infizierten Patienten X4-Viren im fortgeschrittenen HIV-Stadium C (1/6 Patienten (16,6%)). Angaben zur CD4⁺-Zahl waren unter den mit X4-Viren-assoziierten Infektionen nicht gegeben.

Bei den chronischen Infektionen waren vier der mit X4-infizierten Patienten im CDC-Stadium C (4/13 Patienten (30,8%)). Die CD4⁺-Zahl war für drei dieser Patienten bekannt. Sie lag unter 200 Kopien/ml, was für den vorhergesagten Tropismus und das CDC-Stadium plausibel ist. Basierend auf dieser begrenzten Probenanzahl ist jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Tropismus und dem CDC-Stadium herzustellen, besonders weil die restlichen fünf bzw. neun Patienten, die sich im Stadium C befanden, mit R5 bzw. R5X4-Viren klassifiziert wurden und nicht für alle die CD4⁺-Zahl gegeben war.

Dennoch ist der Nachweis von X4-Viren in der frühen Infektionsphase entgegen der aufgestellten Hypothese und korreliert nicht mit den Ergebnissen des Evaluationspanels. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

Ein Grund besteht darin, dass der serologische Rezent-Test eine Fehlerrate (FRR – false recent rate) von 10% aufweist, was bedeutet, dass als rezent klassifizierte Infektionen tatsächlich chronisch sind. Diese Fehlinterpretation könnte mit der Bestimmung des Ko-Rezeptorgebrauchs korrigiert werden. Demnach müssten die kürzlich-erworbenen Infektionen, in denen X4-Viren klassifiziert wurden, als chronisch eingestuft werden. 5,9% der rezenten Infektionen wären somit serologisch falsch klassifiziert wurden.

Ein zweiter Argumentationspunkt ist, dass in der akuten Infektion tatsächlich reine X4-Viren auftreten, diese aber aufgrund der relativ kleinen Probenanzahl des Evaluationspanels ($n=108$) nicht in Erscheinung traten.

In einer französischen Studie, in welcher der HIV-1 Tropismus bei 239 akuten HIV-Infektionen untersucht wurde, wurden in der Tat 6% der Infektionen mit X4-Viren und 94% mit R5-

Viruspopulationen klassifiziert. Diese Untersuchung erfolgte jedoch anhand eines phänotypischen Tropismusassays, der als Goldstandard angesehen wird [10].

Als dritter Punkt ist daher zu argumentieren, dass die genotypischen Tropismusassays weniger sensitiv sind als die phänotypischen Tests, was zu Fehlinterpretationen führt.

Für die Auswertung des Ko-Rezeptorgebrauchs liegen bisher nur Empfehlungen vor, sodass verschiedene Publikationen sich auf eine andere FPR zur Identifizierung von X4-Viren (5,75% [43, 41]; 10%; 20% [45, 46]) beziehen als die in dieser Studie verwendete FPR < 5% (Deutsch-Österreichischen Richtlinien).

Therapie-basierte Publikationen fokussieren meist auf den Vergleich des Ko-Rezeptorgebrauchs bei therapie-naiven und therapierten Patienten. Diese Studien beziehen sich auf eine FPR < 5,75% wie in die von den Europäischen Richtlinien empfohlen. Dieser Wert basiert auf Maraviroc Studien.

Eine FPR über 5,75% korrelieren mit einem Ansprechen auf den CCR5-Antagonisten Maraviroc [29]. Für den Einsatz dieses Medikamentes ist es notwendig, dass keine reinen X4-Viren am Infektionsgeschehen beteiligt sind – weder in Form von Minoritäten noch in dualtropen Populationen. Geno2pheno_[coreceptor]original gibt dabei eine Therapieempfehlung nach dem Benutzer gewählten Grenzwert an. Aufgrund der therapeutischen Relevanz steht bei einer Vielzahl von Studien der Nachweis von R5-Viren im Fokus, anstatt wie in dieser Arbeit X4-Viren.

Parcezewski et al untersuchten den Ko-Rezeptorgebrauch bei therapie-naive Patienten und konnten in HIV-Neudiagnosen in Polen 85,5% R5-Viren klassifizieren [43]. Die Autoren differenzierten jedoch nicht in rezente und chronische Infektionen. Das Ergebnis korreliert jedoch mit dem in dieser Arbeit untersuchten rezenten Neudiagnosen.

Rieder et al hingegen untersuchten das Vorkommen von reinen bzw. gemischten X4-Viruspopulationen in akuten Infektionen anhand von geno2pheno_[coreceptor]original, PSSM_{SINI} und SVMwetcat. Alle drei Algorithmen stimmten in 4/145 (3%) Patienten in der Vorhersage überein, wobei nur für einen (1%) auch phänotypisch das Ergebnis bestätigt werden konnte. In dieser Studie von Rieder et al klassifizierte geno2pheno_[coreceptor]original in 21 von 145 Patienten X4-/R5X4-Viren (14%) [41]. Dies deutet darauf hin, dass geno2pheno_[coreceptor]original den Anteil von X4-Viren überschätzt. Dies wurde bereits in verschiedenen Publikationen bestätigt [15, 23].

Obwohl geno2pheno_[coreceptor]original das meist verwendete Vorhersagemodell in der Praxis ist, arbeitet es nicht zweifelsfrei richtig, insbesondere weil der Algorithmus überwiegend mit Sequenzen des Subtyps B und C trainiert wurde. Auch die Beschränkung auf das V3-Loop von gp120 vermindern die Spezifität und Sensitivität der Vorhersage.

X4-Viren des Subtyps C werden bei einer FPR < 5% möglichst genau vorhergesagt, mit einer Sensitivität von 94% [47]. Auch für den Subtyp G ist die Vorhersage konkordant [26], da die Konsensus-Sequenz ähnlich zu der von Subtyp B ist.

Es wurde bereits publiziert, dass Viren des Subtyps A, die einen X4-Tropismus aufweisen (FPR > 5%), mit einer geringen Genauigkeit klassifiziert werden (Sensitivität: 15,79%) und dadurch der Anteil von X4-Viren unterschätzt wird [6]. Insbesondere bei Viren dieses Subtyps scheint der Ko-Rezeptorgebrauch verstärkt durch das V2-Loops des gp120 vermittelt zu werden [6]. Die V2-Domäne interagiert mit dem V3-Loop und beeinflusst ebenfalls die Bindung des Ko-Rezeptors.

Dies ist ein Beispiel dafür, dass auch Substitutionen außerhalb des V3-Loops von gp120 die Ko-Rezeptorvorhersage beeinflussen können. Zudem beeinflussen Glykosylierungsstellen und Strukturen in gp41 die Bindung des Ko-Rezeptors [6, 42].

Für die Subtypen D sowie CRF02_AG und CRF01_AE zeigt sich ebenfalls eine geringere Spezifität für die Ko-Rezeptorvorhersage [26].

Allerdings wurde kürzlich veröffentlicht, dass bei dem Subtyp CRF01_AE ein verkürztes V3-Loop, bei dem die flankierenden Enden entfernt wurden, die Sensitivität der Tropismus-Vorhersage verbessert.

Bei anderen Subtypen konnte dieser Einfluss eines kürzeren V3-Fragmentes nicht bestätigt werden [48].

Unter den chronischen Infektionen erwies sich eine höhere Diversität und ein größerer Anteil von Nicht-B Subtypen im Vergleich zu den kürzlich-erworbenen Infektionen. Es ist bereits bekannt, dass Patienten mit einer chronischen Nicht-B Infektionen meist erst später bei einem Arzt vorstellig werden.

Unter der Berücksichtigung, dass $\text{geno2pheno}_{[\text{coreceptor}]}$ Original bei den Subtypen A und D sowie bei den CRFs den Anteil von X4-Viren unterschätzt, besteht die Möglichkeit, dass in der Gruppe der chronischen Infektionen mehr Patienten mit X4-Viren infiziert sind als bisher angenommen.

5.3.3 Vergleich der Ko-Rezeptorvorhersage anhand von Sanger-und NGS-Sequenzen rezenter Infektionen

Die typische Populations-basierte V3-Sequenzierung nach Sanger besitzt nur eine geringe Sensitivität für Minoritäten, insbesondere wenn diese unter 20% vorkommen. NGS ist wesentlich sensitiver und kann dadurch auch Minoritäten bis zu Anteilen von 2% detektieren [49, 28]. Dadurch wird ein Querschnitt des Ko-Rezeptorgebrauchs innerhalb der im Patienten vorkommenden Viruspopulation ermöglicht und die Prävalenz von Nicht-R5—HIV quantifiziert [50]. Auch bei Patienten, in denen nach Sanger-Sequenzierung keine reinen X4-Viren

klassifiziert wurden, könnten Minoritäten mit NGS und einem niedrigeren Grenzwert erfasst werden [51, 44]. Es wäre demnach zu erwarten, dass NGS mehr Mischvarianten identifiziert.

81 der 85 rezenten Infektionen wurden neben Sanger auch mit NGS untersucht. Hierbei sollte die klassische Sanger-Sequenzierung direkt mit dem NGS Grenzwert von 20% verglichen werden. Zusätzlich sollte ein niedrigerer Grenzwert (10%) zur Detektion von Minoritäten beitragen.

In dem Vergleich der Sanger-Sequenzierung und dem NGS Grenzwert von 20% wurden mit dem originalen geno2pheno_[coreceptor]-Algorithmus in einem weiteren Patienten X4-Viren identifiziert. Die klinischen Daten geben soweit vorhanden keinen Hinweis auf eine chronische Infektion (Viruslast 2,5E+05 Kopien/ml; CDC-Stadium, CD4⁺-Zellzahl unbekannt).

Mit dem NGS Grenzwert von 10% für Minoritäten wurden keine weiteren X4-Virusinfektionen klassifiziert verglichen mit dem 20% Grenzwert.

Stattdessen konnten mit dem niedrigeren Grenzwert in einem zweiten Patienten dualtrophe Viren detektiert werden, die mit Sanger-Sequenzierung und dem NGS Grenzwert von 20% als R5-Viren klassifiziert wurden. Dualtrophe Viren können jedoch während des gesamten Infektionsgeschehens auftreten.

Beide Patienten wiesen bei der Bestimmung des Ko-Rezeptors mit geno2pheno_[coreceptor] original eine Abnahme der FPR von Sanger zum niedrigen NGS 10% Grenzwert auf. Die Substitutionen innerhalb des V3-Loops nahmen hingegen zu.

In Publikationen, in denen ein größeres Probenpanel untersucht wurde, wurde bestätigt, dass mit NGS mehr Nicht-R5-Viren in Form von Minoritäten detektiert werden als mit Sanger-Sequenzierung [50, 52]. Ambiguitäten oder besondere V3-Substitutionen, die im Zusammenhang mit einem Tropismuswechsel stehen, wurden bisher nicht publiziert.

5.3.4 Limitation der Studie

Eine weitreichende Limitation dieser Studie ist, dass die Mehrheit der Publikation, die sich mit der Auswertung des Ko-Rezeptorgebrauchs beschäftigen, sich auf Plasmaproben und nicht auf die in der Studie verwendeten DSS beziehen. Studien zu der Vorhersage des Tropismus unter Verwendung von Filterproben wurden bisher noch nicht durchgeführt. Zudem ist das hier verwendete Evaluations- sowie Patientenpanel recht klein, um eine signifikante Aussage zum Ko-Rezeptorgebrauch in kürzlich-erworbenen und länger-zurückliegenden Infektionen zu treffen.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine *env*-PCR für DSS optimiert, die zukünftig in der Routine-Diagnostik der Inzidenz-Studie zur Anwendung kommen kann. Die PCR ist insbesondere sensitiv für die Subtypen B und C, allerdings eine bis drei log-Stufen weniger sensitiv für Subtyp A, D und G. Es wäre demnach nötig generische Primer zu design, die für alle Subtypen in ähnlicher Weise sensitiv sind.

Die Bestimmung des HIV-1 Ko-Rezeptors kann zukünftig das Ergebnis der serologischen Rezent-Testung korrigieren.

6 Zusammenfassung

Für einen effizienten Viruseintritt bindet das Humane Immundefizienzvirus (HIV) über das Hüllprotein gp120 den immunogenen Rezeptor CD4 sowie den Ko-Rezeptor CCR5 oder CXCR4 auf Immunzellen. Entsprechend des Ko-Rezeptorgebrauchs werden die Viren in R5- oder X4-Viren bzw. in dualtrope (R5X4) Viren unterschieden. Der Ko-Rezeptorgebrauch wird über die hypervariable Domäne 3 (V3-Loop) des viralen Glykoproteins (gp) 120 vermittelt.

R5-Viren dominieren die frühe Infektionsphase. In 50% der HIV Subtyp B-Infektionen erfolgt als Konsequenz von Mutationen der Übergang zu X4-Viren.

Daraus ergab sich die Hypothese, dass in der frühen Phase der Infektion keine reinen X4-Viren auftreten.

Für die Inzidenz-Studie der Molekularen Surveillance am Robert Koch-Institut werden Filter getropfte Restseren von HIV-Neudiagnosen (DSS - dried serum spots) mit einem anonym erhobenen Meldebogen an das Institut gesandt. Mittels eines serologischen Rezent-Testes erfolgt die Klassifizierung der Infektionen in kürzlich-erworben (< 155 Tage) und chronisch. Der verwendete Rezent-Test weist eine Fehlerrate von 10% auf.

Ziel dieser Arbeit war es Sequenzen des HIV V3-Loops von Patienten mit einer kürzlich-erworbenen Infektion aus einer optimierten *env*-PCR hinsichtlich der aufgestellten Hypothese zu überprüfen. Bei Bestätigung der Annahme soll der Nutzen der genotypischen Ko-Rezeptorvorhersage zur Korrektur für serologisch falsch-rezent eingestufte Infektionen diskutiert werden.

Basierend auf einer semi-nested PCR wurde bereits im Vorfeld eine *env*-PCR für Plasmaproben etabliert. Dieses PCR-Protokoll diente als Grundlage für die Optimierung einer *env*-PCR für die in der Inzidenzstudie verwendeten DSS.

Die Hypothese, dass in der frühen Infektionsphase keine reinen X4-Viren auftreten, wurde zunächst anhand eines Evaluationspanels aus 108 Plasmaproben der Serokonverterkohorte mit bekannter kurzer Infektionsdauer (< 155 Tage) untersucht. Hierfür wurden sechs genotypische Ko-Rezeptor-Vorhersagemodelle (11/25-Regel; geno2pheno_[coreceptor]original; geno2pheno_{C_{NGS}-Sanger}, PSSM_{X4R5}; PSSM_{SINI}, HIVcoPred) verglichen.

Anschließend wurde die für DSS etablierte *env*-PCR sowie das Vorhersagemodell, das mit der Hypothese korreliert, auf ein Probenpanel von HIV-Neudiagnosen (85 rezente Infektionen, 155 chronische Infektionen) aus 2014 (Oktober – Dezember) angewandt, um das Auftreten von X4-Viren zu untersuchen und mit dem Ergebnissen des serologischen Rezent-Tests zu vergleichen. 81 Proben der rezenten Infektionen wurden neben Sanger-Sequenzierung auch mit Next generation sequencing (NGS) nach dem Illumina MiSeq-Prinzip unter Verwendung verschiedener Grenzwerte zur Detektion von Minoritäten untersucht.

Die erfolgreich etablierte *env*-PCR weist für den in Europa stark prävalenten Subtyp B eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 6,0E+02 Kopien/ml auf. Für Subtypen A, C, D, G und die CRF02_AG ist die PCR um ein- bis drei log-Stufen weniger sensitiv.

In dem untersuchten Evaluationspanel aus 108 Plasmaproben konnten mit den genotypischen Vorhersagemodell geno2pheno_[coreceptor]original und PSSM_{X4R5} bzw. PSSM_{SINI} keine reinen X4-Viren in der frühen Infektionsphase nachgewiesen werden, während mit der 11/25-Regel in Verbindung mit der Nettoladung sowie mit geno2pheno_{C_{NGS}-Sanger} in einer von 108 Proben X4-Viren klassifiziert wurden. Für die Untersuchung der HIV-Neudiagnosen aus 2014 wurde geno2pheno_[coreceptor]original verwendet, da dieser Algorithmus von den Deutsch-Österreichischen und Europäischen Richtlinien empfohlen wird.

In der Gruppe der rezenten Infektionen (n=85) wurden in fünf der nach Sanger-sequenzierten Proben X4-Viren identifiziert.

In dem Panel von 81 Proben, das mit Sanger und NGS sequenziert wurde, konnten in vier Sanger-Sequenzen X4-Viren klassifiziert werden. Mit der sensitiveren NGS-Methode waren es bei einem Grenzwert von 20% sowie mit 10% für minoritäre Varianten fünf Patienten.

Im Evaluationspanel konnte die Hypothese, dass keine reinen X4-Viren in der frühen Infektionsphase auftreten, mit dem originalen geno2pheno_[coreceptor]-Algorithmus für alle 108 Proben bestätigt werden. Demnach könnte die Ko-Rezeptorvorhersage zur Korrektur der serologisch falsch-rezent klassifizierten Proben der Inzidenzstudie beitragen.

In den vom ELISA als rezent-eingestuften Infektionen (n=81) identifizierte das Vorhersagemodell 4,9% X4-Viren auf Grundlage von Sanger-Sequenzen und in 6,2% unter Verwendung von NGS-Sequenzen mit den 20% und 10%-Grenzwert.

Demnach könnten die methodische Limitation des ELISAs bei den vier bzw. fünf als „falsch rezent“ eingestuften Patienten durch die Ko-Rezeptorvorhersage korrigiert werden.

Um diese Annahme, dass es sich tatsächlich um die frühe Infektionsphase handelt, fehlen jedoch die klinischen Daten.

So könnten X4-Viren in geringer Konzentration zu Beginn der Infektion auftreten, was von Rieder et al für 1% der frühen Infektionen gezeigt wurde.

Auch methodische Limitationen der Ko-Rezeptorvorhersage und Falschvorhersagen von X4-Viren sind wahrscheinlich, da der originale geno2pheno_[coreceptor]-Algorithmus insbesondere mit Sequenzen des B und C trainiert wurde, sodass Fehlerinterpretationen bei den übrigen HIV-Subtypen auftreten können.

Zudem ist bereits bekannt, dass neben dem V3-Loop auch andere Strukturen innerhalb des gp120 aber auch in gp41 an der Interaktion mit dem Ko-Rezeptor beteiligt sind.

Aus epidemiologische Sicht ist die Bestimmung des Ko-Rezeptorgebrauchs mit geno2pheno_[coreceptor]Original für die Korrektur falsch-rezent klassifizierter Infektionen anwendbar, insbesondere wenn keine klinischen Daten vorliegen. Es trägt demnach zu einer besseren Charakterisierung kürzlich-erworbener HIV-Infektionen unter den HIV-Neudiagnosen in Deutschland bei.

7 Summary

For an efficient viral entry the human immunodeficiency virus (HIV) binds via the envelope glycoprotein gp120 the immunogenic CD4-receptor as well as one of the co-receptors CCR5 or CXCR4. According to the co-receptor usage the viruses are called R5- or X4-viruses. Additionally dualtropic (R5X4) viruses are involved in the infection process. The co-receptor usage is mediated by the hypervariable region 3 (V3-Loop) of gp120.

R5-viruses dominate the early stage of infection. In 50% of HIV subtype B infections a switch to X4-viruses occur as a consequence of mutation events during infection.

Based on this observations the hypothesis developed that no X4-viruses appear during the early stage of infection.

For the incidence project of the molecular surveillance of the Robert Koch-Institute (RKI) 81 national diagnostic laboratories send residual serum of HIV new diagnosis on filter card with an anonymous infection report to the RKI. The samples are classified in recent (<155 days) and chronic infection by a serological Recency Test. This Assay shows a false recent rate of 10%.

The aim of the study was to check the hypothesis by using sequences of HIV-V3-Loop generated in a new established *env*-PCR. If the hypothesis could be confirmed, genotypic co-receptor prediction tools may be used for the correction of serological false-recent classified infections.

Based on a semi-nested PCR an *env*-PCR for plasma samples was established in advance. The PCR-protocol was used for optimization of an *env*-PCR for DSS. But at first the hypothesis of no appearance of X4-viruses during early infection was investigated using an evaluation panel of 108 plasma samples of a seroconverter cohort with known short period of infection. For the investigation six different genotypic prediction tools (11/25-rule with net charge; geno2pheno_[coreceptor]Original; geno2pheno_{C_{NGS-Sanger}}, PSSM_{X4R5}; PSSM_{SINI}, HIVcoPred) were compared.

Afterwards the established *env*-PCR for DSS as well as the prediction tool which correlated with the hypothesis were applied to the patient panel of HIV new diagnosis (85 recent infections, 155 chronic infections) of 2014 (October to December) to check for X4-viruses and to compare it with the results of the Recency Test.

81 samples of recent infections were sequenced with Sanger and next generation sequencing (NGS) using Illumina MiSeq. Two different cut-offs for the detection of minorities were compared.

The *env*-PCR for DSS was established successfully. It shows a high sensitivity for the subtype B which is high prevalent in Europe. The detection limit was at 6,0E+02 copies/ml. For the subtypes A, C, D, G, CRF02_AG the PCR is less sensitive.

The hypothesis of no appearance of X4-viruses during early infections could be confirmed with geno2pheno_[coreceptor] as well as PSSM_{X4R5} and PSSM_{SINI} for the 108 samples of the evaluation panel. In One of the 108 samples X4-viruses were classified using the 11/25 rule in combination with the net charge and geno2pheno_{C_{NGS-Sanger}}. For further analyses geno2pheno_[coreceptor]Original were used because it is recommended by the European guidelines.

In the group of recent infections (n=85) five of the Sanger sequenced samples were classified with X4-viruses. Only 81 samples were sequenced with Sanger and NGS. In four of them X4-viruses were identified using Sanger sequences. With NGS and the cut-offs 20% and 10% for detecting minorities five samples showed this virus variant.

For the evaluation panel the hypothesis can be confirmed for all 108 samples with geno2pheno_[Coreceptor]original. A correction of the serological false recent classified samples of the incidence project seems to be possible.

In the group of serological recent classified infections 4,9% of 81 patients show X4-viruses by using Sanger sequencing. With NGS and the cut offs of 20% as well as 10% in 6,2% X4-viruses were identified. According to this observation four respectively five samples are classified as false recent by the serological Recency Test and should be corrected using the prediction of the co-receptor usage.

But there no evidence whether the patients are really in the early phase of infection because of a lack of clinical data.

There may be other factors which influence the outcome of this study. On the one hand X4 viruses can appear in the early HIV stage less concentrated. Rieder et al published in 1% of acute HIV-infections X4-viruses are detected.

Methodical limitations cannot be excluded, too. The algorithm geno2pheno_[coreceptor]original is especially trained with V3-sequences of subtype B and C, co-receptor misinterpretations may be possible in other subtypes. Additionally it is proven that other structures in gp120 as well as in gp41 are involved in co-receptor interactions.

From the epidemiological point of view the prediction of the coreceptor usage could be used to correct serological false-recent classified infections, especially if there is no clinical data available. On this way it helps to characterized recent infections of HIV new diagnosis.

8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei der Arbeitsgruppe FG18 – HIV und andere Retroviren unter der Leitung von Herrn Prof. Norbert Bannert des Robert Koch-Instituts bedanken.

Für die Unterstützung bei praktischen sowie theoretischen Fragen geht mein Dank insbesondere an Frau Dr. Andrea Hauser und an das HIV-Studienlabor:

Frau Dr. Claudia Kücherer, Frau Dr. Patrycja Machnowska, Frau Katrin Arndt, Frau Ewelina Caspers, Frau Sabrina Neumann und Herrn Hanno von Spreckelsen.

Auch vielen Dank an Frau Dr. Britta Altmann und Frau Dr. Kirsten Hanke für Fragestellungen im Bereich NGS.

Für die tatkräftige Unterstützung bei Formatierungsfragen und für das Korrekturlesen in letzter Minute möchte mich auch herzlich bei Herrn Carlo Schäfer bedanken.

9 Literaturverzeichnis

- [1] C. f. D. C. (CDC)., „Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California,“ *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, Bd. 25, pp. 305-8, 1981.
- [2] S. Modrow, D. Falke, U. Truyen und H. Schätzl, *Molekulare Virologie*, 2. Hrsg., Springer Spektrum, 2003, 2010.
- [3] B. Hahn, G. Shaw, K. Cock und P. Sharp, „AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications,“ *Science*, Bd. 5453, pp. 607-614, 2000.
- [4] <http://www.hivleitfaden.de/cms/index.asp?inst=hivleitfaden&snr=2173>. [Online].
- [5] J.-C. Plantier, M. Leoz, J. E. Dickerson, F. D. Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemée, F. Damond, D. L. Robertson und F. Simon, „A new human immunodeficiency virus derived from gorillas,“ *Nature Medicine*, Nr. 15, pp. 871 - 872, 2009.
- [6] M. Riemenschneider, K. Cashin, B. Budeus, S. Sierra, E. Shirvani-Dastgerdi, S. Bayanolhagh, R. Kaiser, P. Gorry und D. Heider, „Genotypic Prediction of Co-receptor Tropism of HIV-1 Subtypes A and C,“ *Scientific Reports*, Bd. 6, Nr. 24883, 2016.
- [7] Robert-Koch-Institut, „HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung,“ 2014. [Online].
- [8] Robert-Koch Institut, Berlin, „Epidemiologisches Bulletin - HIV-Diagnosen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland 2014“.
- [9] Calypte Biomedical Corporation, *Aware™ BED™ EIA HIV-1 Incidence test - Manual*.
- [10] S. Raymond, F. Nicot, K. Sauné, M. Cazabat, C. Pasquier, P. Massip, B. Marchou, P. Delobel und J. Izopet, „HIV-1 Tropism during Primary Infections in France: 1996-2014,“ *J Acquir Immune Defic Syndr*, 03 2016.
- [11] C. Hoffmann und J. K. Rockstroh, „HIV-Buch 2014/15,“ Medizin Fokus Verlag, 2014.
- [12] H. W. Gerlich und D. Wolfram, *Medizinische Virologie*, Thieme, 2009.
- [13] C. Teixeira, J. Gomes, P. Gomes, F. Maurel und F. Barbault, „Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug,“ *European Journal of Medicinal Chemistry*, Bd. 46, pp. 979-992, 2011.

- [14] M. A. Checkley, B. G. Luttge und E. O. Freed, „HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation,“ *Journal of Molecular Biology*, Bd. 410, Nr. 4, p. 582–608, 2011.
- [15] B. Schwalbe und M. Schreiber, „Effect of lysine to arginine mutagenesis in the V3 loop of HIV-1 gp120 on viral entry efficiency and neutralization,“ *PLoS One*, Bd. 10, Nr. 3, 2015.
- [16] S. Fiedler, Strukturelle und Funktionelle Charakterisierung von HIV-1 Hüllproteinen, Masterarbeit, 2012.
- [17] O. Sander, T. Sing, I. Sommer, A. Low, P. Cheung, P. Harrigan, T. Lengauer und F. Domingues, „Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage,“ *PLoS Comput Biol*, Bd. 3, 2007.
- [18] P. J. Klasse, „The molecular basis of HIV entry,“ *Cellular Microbiology*, pp. 1183-1192, 2012.
- [19] E. Fenyö, J. Albert und B. Asjö, „Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV,“ *AIDS*, pp. 5-12, 1989.
- [20] T. Dragic, V. Litwin, G. Allaway, S. Martin, Y. Huang, K. Nagashima, C. Cayanan, P. Maddon, R. Koup, J. Moore und W. Paxton, „HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5,“ *Nature*, pp. 667 - 673, 1996.
- [21] C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski und T. Springer, „The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry,“ *Nature*, Bd. 6594, pp. 829-33, 1996.
- [22] C. Hoffmann, „The epidemiology of HIV coreceptor tropism,“ *European Journal of Medical Research*, pp. 358-390, 2007.
- [23] C. Verhofstede, M. Nijhuis und L. Vandekerckhove, „Correlation of coreceptor usage and disease progression,“ *Curr Opin HIV AIDS*, pp. 432-439, 2012.
- [24] V. Kouri, R. Khouri, Y. Alemán, Y. Abrahantes, J. Vercauteren, A. Pineda-Peña, K. Theys, S. Megens, M. Moutschen, N. Pfeifer, J. Van Weyenbergh, A. Pérez, J. Pérez, L. Pérez, K. Van Laethem und A. Vandamme, „CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba,“ *EBioMedicine*, Bd. 2, Nr. 3, pp. 244-254, 2015.

- [25] K. Duri, „Coreceptor Usage in HIV Infection,“ in *Immunology and Microbiology*, 2012, pp. 235-256.
- [26] M. Mulinge, M. Lemaire, J. Servais, A. Rybicki, D. Struck, E. da Silva, C. Verhofstede, Y. Lie, C. Seguin-Devaux, J. Schmit und D. Bercoff, „HIV-1 tropism determination using a phenotypic Env recombinant viral assay highlights overestimation of CXCR4-usage by genotypic prediction algorithms for CRF01_AE and CRF02_AG,“ *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 5, 2013.
- [27] T. Sing, A. Low, N. Beerenwinkel, O. C. P. Sander, F. Domingues, J. Büch, M. Däumer, R. Kaiser, T. Lengauer und P. Harrigan, „Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates,“ *Antiviral Ther*, Bd. 7, pp. 1097-106, 2007.
- [28] D. u. Ö. AIDS-Gesellschaft, „Empfehlungen zur Bestimmung des HIV-1-Korezeptor-Gebrauches,“ 2014.
- [29] L. Vandekerckhove, A. Wensing, R. Kaiser, F. Brun-Vézinet, B. Clotet, A. De Luca, S. Dressler, F. Garcia, A. Geretti, T. Klimkait, K. Korn, B. Masquelier und C. Perno, „European guidelines on the clinical management of HIV-1,“ *Lancet Infect Dis*, p. 05, 2011.
- [30] R. Kumar und G. Raghava, „Hybrid Approach for Predicting Coreceptor Used by HIV-1 from Its V3 Loop Amino Acid Sequence,“ *PLoS ONE*, 2013.
- [31] J. Soropositivo, „AIDS by the numbers 2015,“ <http://de.scribd.com/doc/292535802/Aids-by-the-Numbers-2015-UNAIDS-Report#scribd>, 2015.
- [32] Biomerieux, Biomerieux , [Online]. Available: <http://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/nuclisensr-easymag>.
- [33] Thermo Fisher Scientific, „<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/reverse-transcription/reverse-transcriptase-enzymes/superscript-iii-reverse-transcriptase.html>,“ [Online].
- [34] beckmancoulter, [Online]. Available: http://www.beckmancoulter.de/Life+Science/Molekularbiologie/DNA_RNA_Aufreinigung/AMPure+XP.html.
- [35] „<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=next-generation-sequencing>,“ [Online].

- [36] A. Bolger, M. Lohse und B. Usadel, „Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data,“ *Bioinformatics*, Bd. 30, Nr. 15, pp. 2114-20, 2014.
- [37] T. Magoč und S. Salzberg, „FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies,“ *Bioinformatics*, Bd. 27, Nr. 21, pp. 2957-63, 2011.
- [38] J. Archer, G. Baillie, S. Watson, P. Kellam, A. Rambaut und D. Robertson, „Analysis of high-depth sequence data for studying viral diversity: a comparison of next generation sequencing platforms using Segminator II,“ *BMC Bioinformatics*, Bd. 13, Nr. 47, 2012.
- [39] J. Shin, G. Ming und H. Song, „Decoding neural transcriptomes and epigenomes via high-throughput sequencing,“ *Nature Neuroscience*, p. 1463–1475, 2014.
- [40] K. Terpe, „PCR-Faktoren-DNA-Polymerase & Annealingtemperatur,“ *BIOspektrum*, pp. 649-652.
- [41] P. Rieder, B. Joos, A. Scherrer, H. Kuster, D. Braun, C. Grube, B. Niederöst, C. Leemann, S. Gianella, K. Metzner, J. Bön, R. Weber und H. Günthard, „Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Diversity and Tropism in 145 Patients With Primary HIV-1 Infection,“ *Clin Infect Dis*, Bd. 53, Nr. 12, pp. 1271-1279, 2011.
- [42] S. Dimonte, F. Mercurio, V. Svicher, R. D'Arrigo, C. Perno und F. Ceccherini-Silberstein, „Selected amino acid mutations in HIV-1 B subtype gp41 are associated with specific gp120v₃ signatures in the regulation of co-receptor usage,“ *Retrovirology*, Bd. 8, Nr. 33, 2011.
- [43] M. Parczewski, A. Urbańska, K. Maciejewska, J. Clark und M. Leszczyszyn-Pynka, „Association of chemokine receptor gene variants with HIV-1 genotype predicted tropism,“ *HIV Medicine*, Bd. 10, pp. 577-86, 2014.
- [44] Z. Brumme, J. Goodrich, H. Mayer, C. Brumme, B. Henrick, B. Wynhoven, J. Asselin, P. Cheung, R. Hogg, J. Montaner und P. Harrigan, „Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals,“ *The Journal of Infectious Diseases*, Bd. 192, Nr. 3, pp. 466 - 474, 2005.
- [45] M. Santoro, D. Armenia, L. Fabeni, M. Santoro, C. Gori, F. Forbici, V. Svicher, A. Bertoli, L. Dori, M. Surdo, E. Balestra, G. Palamara, E. Girardi, G. Angarano, M. Andreoni, P. Narciso, A. Antinori, F. Ceccherini-Silberstein und C. Perno, „The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients,“ *Clin Microbiol Infect*, Bd. 18, Nr. 8, 2012.

- [46] V. Svicher, E. Balestra, V. Cento, L. Sarmati, L. Dori, I. Vandenbroucke, R. D'Arrigo, A. Buonomini, H. Van Marck, M. Surdo, P. Saccomandi, W. Mostmans, J. Aerssens, S. Aquaro, L. Stuyver, M. Andreoni, F. Ceccherini-Silberstein und C. Perno, „HIV-1 dual/mixed tropic isolates show different genetic and phenotypic characteristics and response to maraviroc in vitro,“ *Antiviral Research*, Bd. 1, pp. 42-53, 2011.
- [47] S. Crous, R. Shrestha und S. Travers, „Appraising the performance of genotyping tools in the prediction of coreceptor tropism in HIV-1 subtype C viruses,“ *BMC Infectious Diseases*, Bd. 12, Nr. 203, 2012.
- [48] M. Zingg, A. Haas, R. Kaiser, W. Sugiura, N. Labhardt und T. Klimkait, „Does shortening V3-information impact on genotypic HIV-1 tropism prediction?,“ 2016.
- [49] E. Bunnik, L. Swenson, D. Edo-Matas, W. Huang, W. Dong, A. Frantzell, C. Petropoulos, E. Coakley, H. Schuitemaker, P. Harrigan und A. van 't Wout, „Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing,“ *PLoS Pathog*, Bd. 6, 2011.
- [50] L. Swenson, T. Mo, W. Dong, X. Zhong, C. Woods, M. Jensen, A. Thielen, D. Chapman, M. Lewis, I. James, J. Heera, H. Valdez und P. Harrigan, „Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients,“ *J Infect Dis*, Bd. 2, pp. 237-45, 2011.
- [51] T. Lengauer, O. Sander, S. Sierra, A. Thielen und R. Kaiser, „Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage,“ *Nature Biotechnology*, Bd. 25, Nr. 12, pp. 1407-1410, 2007.
- [52] S. Raymond, A. Saliou, F. Nicot, P. Delobel, M. Dubois, R. Carcenac, K. Sauné, B. Marchou, P. Massip und J. Izopet, „Characterization of CXCR4-using HIV-1 during primary infection by ultra-deep pyrosequencing,“ *J Antimicrob Chemother*, Bd. 68, Nr. 12, pp. 2875-81, 2013.
- [53] „Viralzone,“ [Online]. Available: <http://viralzone.expasy.org/>.
- [54] N. Yao, C. Zhang, Q. Liu, J. Liu und Z. C., „Polymorphism characteristics of HIV-1 gp120 and 5 hypervariable regions,“ *Turk J Med Sci*, Bd. 45, Nr. 1, pp. 47-52, 2015.
- [55] E. Berger, P. Murphy und J. Farber, „HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection.,“ *Annu Rev Immunol*, pp. 657-700, 1999.
- [56] K. P. Yousef, „Dynamics of HIV-1 infections in Germany inferred from clusters of recent seroconverters,“ Robert-Koch-Institut, Berlin, 2016.

- [57] M. Jensen, F. Li, A. van 't Wout, D. Nickle, C. Shriner, H. He, S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. Margolick und J. Mullins, „Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of HIV-1 env V3 loop sequences,“ pp. 13376-13388, 2003.
- [58] L. Milich, B. Margolin und R. Swanstrom, „V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability,“ *Journal of Virology*, Bd. 67, Nr. 9, p. 5623–5634, 1993.
- [59] N. Pfeifer und T. Lengauer, „Improving HIV coreceptor usage prediction in the clinic using hints from next-generation sequencing data,“ *Bioinformatics*, Bd. 28, Nr. 18, pp. 589-595, 2012.
- [60] R. Connor, K. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe und N. Landau, „Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals,“ *J Exp Med*, Bd. 4, pp. 621-8, 1997.
- [61] A. Trkola, A. Pomales, H. Yuan, B. Korber, P. Maddon, G. Allaway, H. Katinger, C. Barbas, D. Burton, D. Ho und e. al, „Cross-Clade Neutralization of Primary Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Human Monoclonal Antibodies and Tetrameric CD4-IgG1,“ *Journal of Virology*, Bd. 69, Nr. 11, p. 609–6617, 1995.
- [62] P. Sharp, Hahn und B, „Origins of HIV and the AIDS Pandemic,“ *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011.

10 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jena, den 19.09.2016

Madlen Peisker

11 Anhang

11.1 Vergleich verschiedener computer-basierter Algorithmen für die Vorhersage des Ko-Rezeptorgebrauchs anhand eines Evaluationspanels

Tabelle 19 Vergleich verschiedener Vorhersagemodelle anhand des Evaluationspanels

Vorhersage-Methode		R5	R5X4	X4
11/25 Regel mit Nettoladung (n=108)	n	107	0	1
	in %	99,1	0,0	0,9
Geno2pheno _[Coreceptor] Original - Klinik (n=108)	n	95	13	0
	in %	88,0	12,0	0,0
geno2pheno _[coreceptor] original + Klinik (n= 108)	n	106	2	0
	in %	98,1	1,9	0,0
geno2phenoC _{NGS-Sanger} (n= 108)	n	107	0	1
	in %	99,1	0	0,9
WebPSSM _{X4R5} (n= 94)	n	88	6	0
	in %	93,9	6,3	0,0
WebPSSM _{SINI} (n= 99)	n	89	10	0
	in %	89,9	10,1	0,0
HIVcoPred (n=108)	n	0	0	108
	in %	0,0	0,0	100

11.2 Subtypenanalyse in rezenter und chronischen Infektionen

Tabelle 20 Subtypenverteilung der länger-bestehenden Infektionen

Subtypen		Verteilung (n = 155)		
<i>pollenv</i>	Summenwertung			
A/A	A	6		3,9%
B/B	B	102		65,8%
C/C	C	9		5,8%
D/D	D	1		0,6%
G/G	G	2		1,3%
CRF02_AG/A (AG)	CRF02_AG	20		12,9%
CRF01_AE/AE	CRF01_AE	2		1,3
CRF20_BG/CRF20_BG	CRF20_BG	1		0,6
CRF06_cpx/CRF32_06A1	CRF32_06A1	1		0,6
CRF06_cpx/G (06_cpx)	CRF06_cpx	1		0,6
CRF29_BF/B	CRF29_BF	1		0,6
B/CRF02_AG	URF	1		0,6
C/B	URF	1		0,6
C/A	URF	2		1,3
CRF01_AE/B	URF	1		0,6
G/CRF02_AG	URF	2		1,3
CRF02_AG/06_cpx	URF	1		0,6
A/CRF01_AE	URF	1		0,6

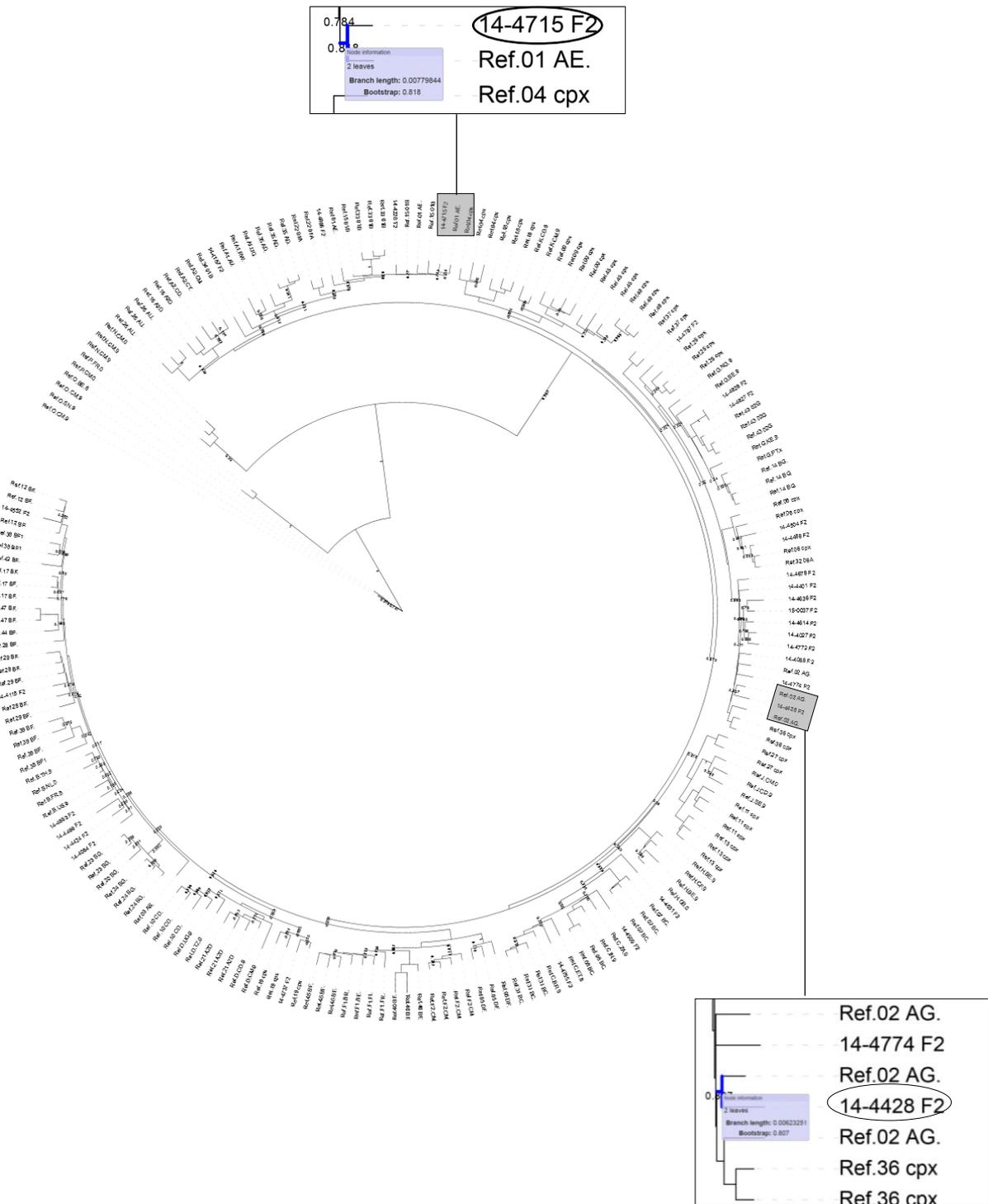


Abbildung 29 Phylogenetischer Baum anhand der *pol*-Genomregion

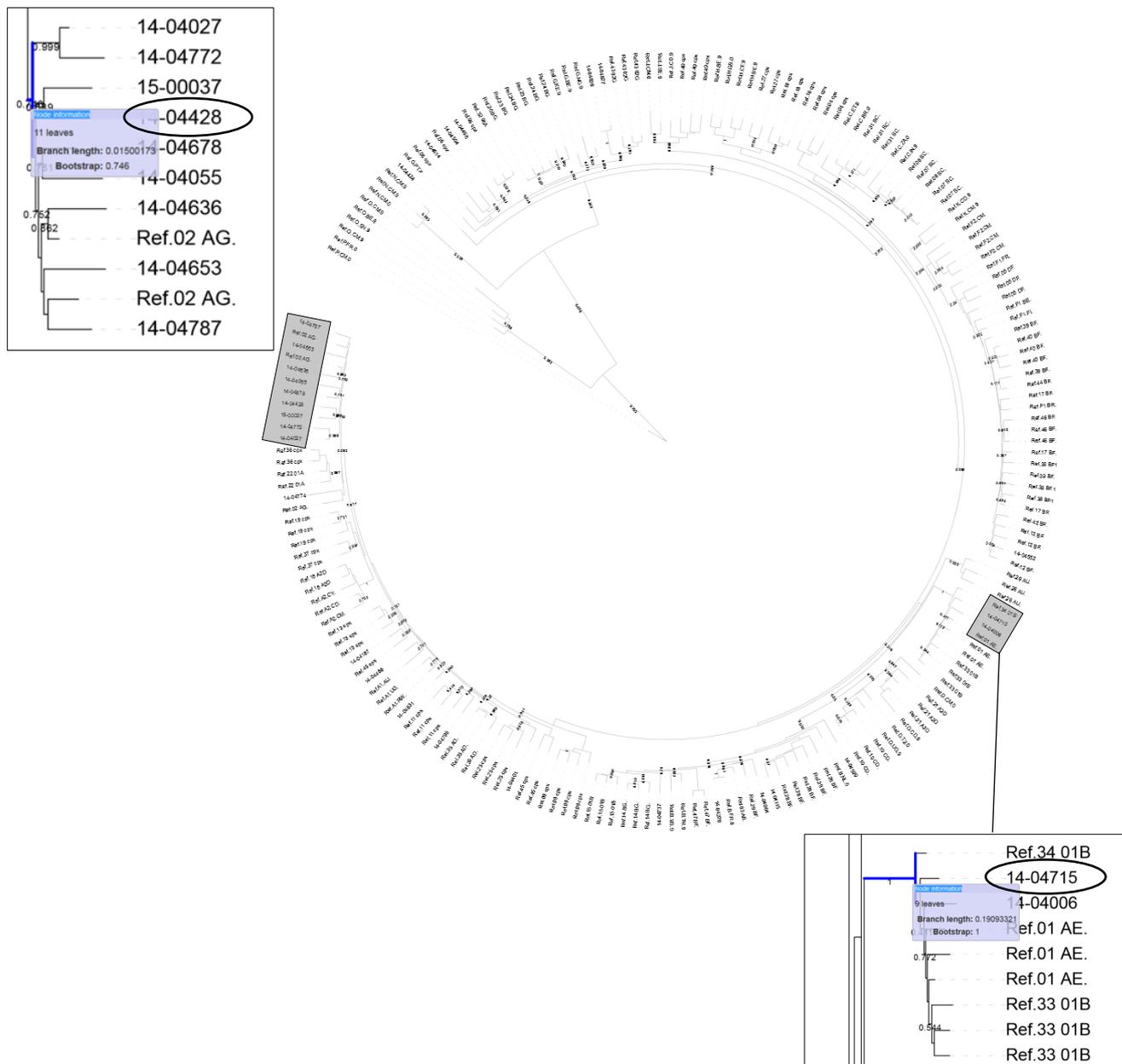


Abbildung 30 Phylogenetischer Baum anhand der *env*-Genomregion

11.3 Verteilung des Ko-Rezeptorgebrauchs in rezenten und chronischen Infektionen

Tabelle 21 Verteilung des Ko-Rezeptorgebrauches im Patientenpanel

	Rezente Infektion		Chronische Infektion	
	n	in %	n	in %
X4 (< 5%)	5	5,9	12	7,7
R5X4 (5-15%)	9	10,6	25	16,1
R5 (> 15%)	71	83,5	118	76,1
Gesamt	85		155	

11.4 Korrelationsanalyse hinsichtlich des Ko-Rezeptorgebrauchs, der Viruslast und des CDC-Stadium bei Patienten mit Angaben zur CD4⁺-Zahl

Tabelle 22 Vergleich FPR, Viruslast und CD4⁺-Zahl anhand rezenter Infektionen

Nr.	FPR	Viruslast in Kopien/ml	CD4 ⁺ -Zellen/ml	CDC
1	8,5%	6,9E+05	32	C
2	16,0%	3,1E+05	164	unbekannt
3	17,0%	1,0E+07	484	A
4	28,2%	1,1E+03	474	A
5	34,9%	0,0E+00	497	A
6	42,0%	1,9E+05	539	A
7	42,7%	6,8E+03	612	A
8	44,6%	2,6E+06	530	A
9	49,0%	2,9E+04	516	A
10	57,1%	4,9E+05	434	B
11	57,1%	5,3E+05	632	A
12	66,6%	2,6E+05	523	A
13	72,0%	3,1E+05	277	unbekannt
14	74,6%	1,0E+07	120	A
15	77,2%	2,0E+01	414	A
16	82,9%	3,0E+05	301	A
17	83,2%	1,3E+05	477	A
18	86,1%	4,2E+05	28	C

19	86,5%	1,0E+04	704	A
20	86,8%	3,5E+04	535	A
21	94,1%	1,4E+04	835	unbekannt
22	95,5%	0,0E+00	420	A
23	95,5%	8,4E+04	494	A
24	97,0%	1,0E+07	664	A

Tabelle 23 Korrelation zwischen klinischen Parametern und Ko-Rezeptor-Vorhersage
mittels Spearman-Korrelationskoeffizient in rezenten Infektionen (n =24)

Gegenübergestellte Parameter	p-Wert (Signifikanz, wenn p < 0,05)
Ko-Rezeptor-Viruslast	0,5
Ko-Rezeptor – CD4 ⁺ -Zahl	0,3
Viruslast - CD4 ⁺ -Zahl	0,4

Tabelle 24 Vergleich FPR, Viruslast und CD4⁺-Zahl anhand chronischer Infektionen

Nr.	FPR	Viruslast in Kopien/ml	CD4 ⁺ -Zellen/ml	CDC
1	0,0%	3,4E+04	352	B
2	0,1%	4,8E+04	11	C
3	2,2%	1,5E+05	140	C
4	3,7%	0,0E+00	54	C
5	4,8%	6,0E+04	136	B
6	5,3%	1,5E+05	5	C
7	7,3%	0,0E+00	700	B
8	7,4%	4,3E+04	469	unbekannt
9	7,8%	2,0E+06	51	C
10	8,1%	1,1E+04	378	A
11	8,5%	2,6E+04	262	A
12	13,0%	4,9E+03	76	A
13	13,8%	2,2E+05	556	A
14	16,2%	3,9E+04	550	B
15	16,6%	0,0E+00	53	B
16	17,0%	2,8E+05	28	unbekannt
17	18,2%	4,5E+04	509	A
18	18,3%	7,7E+04	65	C
19	19,2%	2,2E+05	27	B

20	31,7%	6,1E+02	208	C
21	33,9%	1,4E+04	382	A
22	35,3%	5,4E+03	410	A
23	38,0%	3,8E+04	391	unbekannt
24	42,5%	2,3E+05	202	unbekannt
25	42,6%	1,1E+04	517	A
26	43,2%	8,2E+03	641	A
27	48,7%	5,5E+06	201	B
28	49,7%	3,6E+04	560	unbekannt
29	49,7%	1,3E+05	628	A
30	50,5%	2,7E+03	290	A
31	51,6%	2,0E+05	151	B
32	54,1%	1,6E+05	58	A
33	58,7%	1,4E+05	329	A
34	63,1%	0,0E+00	15	B
35	72,6%	9,9E+02	5	C
36	72,7%	2,7E+04	513	A
37	73,7%	7,5E+05	45	B
38	74,0%	0,0E+00	255	C
39	81,1%	1,9E+03	572	A
40	81,4%	1,2E+05	115	B
41	89,1%	1,7E+05	231	B
42	96,5%	7,3E+05	33	C

Tabelle 25 Korrelation zwischen klinischen Parametern und Ko-Rezeptor-Vorhersage
mittels Spearman-Korrelationskoeffizient in chronischen Infektionen (n =42)

Gegenübergestellte Parameter	p-Wert (Signifikanz, wenn p < 0,05)
Ko-Rezeptor-Viruslast	0,7
Ko-Rezeptor – CD4 ⁺ -Zahl	0,8
Viruslast - CD4 ⁺ -Zahl	0,1

11.5 Vergleich X4/R5X4-Vorhersage anhand von Sanger und NGS-Sequenzen

Tabelle 26 Vorhersage von X4 und R5X4-Viren anhand von Sanger-und NGS-Sequenzen

Sanger-Sequenzierung	NGS (Grenzwert: 20%)	NGS (Grenzwert: 10%)
R5X4	X4	X4
X4	X4	X4
R5X4	R5X4	R5X4
R5	R5	R5X4
R5X4	R5X4	R5X4