

FREIE UNIVERSITÄT BERLIN
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biologie

***Optimierung von PCR-Methoden zur sensitiven Quantifizierung
und Charakterisierung des proviralen Reservoirs in
HIV-1 infizierten Patienten***

MASTERARBEIT

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

MASTER OF SCIENCE (M.Sc.)

vorgelegt von

Vanessa Lamm

angefertigt am

ROBERT KOCH INSTITUT

Fachbereich 18: „HIV und andere Retroviren“

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert, Robert Koch Institut
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin
Abgabe: Berlin, Februar 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 HIV und AIDS	1
1.1.1 Die taxonomische Einteilung von HIV.....	2
1.1.2 Der Ursprung von HIV.....	3
1.1.3 Virusmorphologie	3
1.1.4 Genomaufbau und virale Proteine.....	4
1.1.5 Replikationszyklus.....	6
1.1.6 Pathogenese	8
1.1.7 HIV-Therapie.....	10
1.1.8 Latente Virusreservoir.....	10
1.2 T-Lymphozyten.....	11
1.2.1 Subtypen von T-Gedächtniszellen	12
1.2.2 CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen als latentes HIV-Reservoir	14
1.3 Zielstellung.....	15
2 Material.....	16
2.1 Antikörper und Mikrobeads	16
2.2 Biologisches Material	16
2.3 Chemikalien, Lösungen.....	17
2.4 Kommerzielle Kits	17
2.5 Medien und Zusätze	17
2.6 Puffer, Enzyme und Größenstandards.....	18
2.7 PCR Komponenten.....	18
2.8 Geräte	19
2.9 Software.....	20
3 Methoden	21
3.1 Molekularbiologische Methoden	21
3.1.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion.....	21
3.1.2 Quantitative Echtzeit-PCR	22
3.1.3 Nested Polymerase-Kettenreaktion.....	24
3.1.4 Digitale Polymerase-Kettenreaktion	24

3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
3.1.6	Herstellung von Plasmidstandardreihen	26
3.1.7	DNA-Isolationsmethoden.....	27
3.2	Zellbiologische Methoden.....	28
3.2.1	Zellkultur	28
3.2.2	Herstellung von Zellpellets.....	29
3.2.3	Ficoll-Hypaque Zentrifugation.....	29
3.2.4	Infektion von PBMCs mit HIV-1.....	30
3.2.5	Zellfixierung	31
3.2.6	p24 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	31
3.2.7	Magnetic Activated Cell sorting.....	32
3.2.8	Fluorescence Activated Cell Sorting.....	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Ablauf zur Quantifizierung proviraler HIV-1 DNA.....	34
4.2	Optimierung der Zellysebedingungen.....	35
4.2.1	CCR5 Standardreihe	35
4.2.2	Verringerung des Lysevolumens.....	36
4.2.3	Anpassung der Zellzahl.....	37
4.2.4	Test der neuen Lysebedingungen mit Patientenproben.....	39
4.3	HIV-1/CCR5 qPCR.....	40
4.3.1	HIV-1/CCR5 Standardreihe.....	40
4.3.2	Sensitivität der HIV-1/CCR5 qPCR.....	41
4.4	Etablierung einer nested-PCR.....	44
4.4.1	Optimierung der äußeren PCR.....	44
4.4.2	Sensitivität der nested-PCR.....	45
4.5	<i>In vitro</i> Infektion von PBMCs.....	48
4.5.1	Sortierung der <i>in vitro</i> infizierten PBMCs mittels FACS.....	49
4.5.2	HIV-1/CCR5 qPCR von <i>in vitro</i> infizierten PBMCs.....	49
4.6	Messung von Patientenproben.....	51
4.6.1	HIV-1 Serokonverterstudie	51
4.6.2	Langzeitinfizierte HIV-1 Patienten.....	52
4.7	ddPCR als alternative Quantifizierungsmethode	56
4.7.1	Übertragung des HIV-1/CCR5 qPCR Assays auf ddPCR.....	56
4.7.2	Vergleich qPCR und ddPCR	57
5	Diskussion.....	59

5.1	Verbesserte Probenvorbereitung durch Anpassung der Lysebedingungen.....	59
5.2	qPCR zur Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 in einem Ansatz	60
5.3	Etablierung einer nested-PCR zum hochsensitiven Nachweis von HIV-1	62
5.4	Quantifizierung von HIV-1 Proviren in infizierten PBMCs	63
5.5	Quantifizierung von HIV-1 Proviren in Patientenproben	64
5.6	ddPCR als alternative Quantifizierungsmethode	66
6	Zusammenfassung.....	68
7	Abstract.....	69
8	Ausblick	70
9	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	81
	Eidesstattliche Erklärung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

ACH-2	humane T-Zelllinie
AG	Antigen
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collections</i>
BHQ1	Black Hole Quencher® 1
bidest.	Zweifach destiliert
bp	Basenpaare
BV605	Brilliant Violet 605™
CA	HIV Kapsidprotein
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cf2Th	Canine Zelllinie, <i>Canis familiaris</i> 2 Thymus
CrFK	Feline Zelllinie, <i>Crandell Rees feline kidney cells</i>
C_T	<i>Cycle Treshold</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
ddPCR	Droplet Digital Polymerasekettenreaktion
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dsDNA	doppelsträngige DNA
DüPa	Düsseldorfer Patient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbend assay</i>
env, Env	<i>Envelope</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
FACS	<i>Flourescence activated cell sorting</i>
FAM	Carboxyfluorescin
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
for	<i>Forward</i>

g	g-Kraft
<i>gag, Gag</i>	gruppenspezifische Antigene
gDNA	genomische DNA
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HEX	Hexachlorofluorescin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettichperoxidase
IC	Intrazellular
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IN	HIV Integrase
INI	Integrase Inhibitor
in-PCR	Innere PCR einer nested-PCR
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LI	HIV Linkerprotein
LTR	Long Terminal Repeat
MA	HIV Matrixprotein
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger RNA
NC	HIV Nukleokapsidprotein
Nef	<i>Negative factor</i>
NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
OPD	Orthophenylendamin
ORF	Offener Leserahmen
out-PCR	Äußere PCR einer nested-PCR
p	Protein
PBMCs	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohemagglutinin
PI	Protease Inhibitor
<i>pol, Pol</i>	Polymerase
<i>pr</i>	<i>Precursor</i>
PR	HIV Protease
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Rev	<i>Regulator of virion proteins</i>
<i>rev</i>	<i>Reverse</i>
RH, RNaseH	HIV Ribonuklease H
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	X-Rhodamin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	HIV Reverse Transkriptase
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
ssRNA	Einzelsträngige RNA
SU	HIV Oberflächenprotein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tat	<i>Transactivator of transcription</i>
TCID50	<i>Tissue culture infection dose 50</i>
T_{CM}	Central Memory Cell
TCR γ/δ	Gamma-delta-T-Zelle
T_E	Effektor T-Zelle
T_{EM}	Effektor T-Gedächtniszelle
TM	HIV Transmembranprotein
T_N	Naive T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T_{SCM}	Stammzellähnliche T-Gedächtniszelle
T_{TE}	Terminale T-Gedächtniszelle
T_{TM}	Transistorische T-Gedächtniszelle

UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
Vpu	<i>Viral protein rapid</i>

Nukleinsäuren:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Retroviren	2
Abbildung 2: Morphologie des HIV-1 Viruspartikels	4
Abbildung 3: HIV-1 Genomorganisation	5
Abbildung 4: HIV Replikationszyklus	7
Abbildung 5: Verlauf einer HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie	9
Abbildung 6: Subtypen der T-Gedächtniszellen und naive T-Zellen	12
Abbildung 7: Workflow zur Quantifizierung von HIV-1 in Subpopulationen von CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen.....	34
Abbildung 8: CCR5 Plasmidstandardreihe	35
Abbildung 9: Einfluss des Lysevolumens auf CCR5 Wiederfindungsrate	36
Abbildung 10: CCR5 qPCR mit verschiedenen Zelllysaten, konventionelle PCR mit CrFK Zellen	37
Abbildung 11: Einfluss von CrFK Zellen auf die Lyseeffizienz und das HIV-1/CCR5 Signal der qPCR	38
Abbildung 12: Analyse der „DüPa“ Proben mit unterschiedlichen Lysebedingungen	39
Abbildung 13: HIV-1/CCR5 Plasmidstandardreihe	40
Abbildung 14: qPCR der untersten Stufe der Standardreihe und passende Poisson-Verteilung	41
Abbildung 15: Sensitivität HIV-1/CCR5 qPCR mit ACH-2 in C8166 DNA.....	42
Abbildung 16: Sensitivität HIV-1/CCR5 qPCR mit einer Verdünnungsreihe aus ACH-2 Zellen	43
Abbildung 17: Einfluss verschiedener Primer- oder MgCl ²⁺ -Konzentrationen auf die nested-PCR.....	44
Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese der Gradienten-PCR.....	45
Abbildung 19: Vergleich qPCR und nested-PCR mit der HIV-1/CCR5 Standardreihe.....	46
Abbildung 20: Sensitivität der nested-PCR mit ACH-2 DNA in C8166 DNA.....	46
Abbildung 21: nested-PCR mit Verdünnungsreihe aus ACH-2 Zellen	47
Abbildung 22: <i>In vitro</i> Infektion von PBMCs mit HIV-1 _{Bal}	48
Abbildung 23: Quantifizierung von CCR5 und HIV-1 in <i>in vitro</i> infizierten PBMCs	50
Abbildung 24: Anteil der Subpopulationen an der Gesamtzellzahl und Frequenz der HIV-1 Kopien	50
Abbildung 25: Analyse Serokonverter Proben	51
Abbildung 26: Sortierung der Patientenprobe 2 mittels FACS.....	52
Abbildung 27: Ergebnisse der CCR5 Quantifizierung von Patientenproben mittels qPCR ...	54
Abbildung 28: Ergebnisse der HIV-1 Quantifizierung von Patientenproben mittels qPCR ..	54
Abbildung 29: Ergebnisse der nested-CR mit sortierten CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen von HIV-1 Langzeitpatienten.....	55
Abbildung 30: Temperaturgradienten-PCR mit PBMC DNA und pNL4-3 Plasmid-DNA.....	56
Abbildung 31: ddPCR mit ACH-2 DNA in H ₂ O bidest. und in Zelllysate.....	57
Abbildung 32: Vergleich ddPCR und qPCR.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expression Oberflächenmarker durch naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen, basierend auf.....	12
Tabelle 2: Antikörper und Mikrobeads mit Bezugsquelle.....	16
Tabelle 3: Biologisches Material mit Bezugsquelle.....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen mit Bezugsquelle.....	17
Tabelle 5: Kommerzielle Kits mit Bezugsquelle.....	17
Tabelle 6: Medien und Zusätze mit Bezugsquelle.....	17
Tabelle 7: Puffer, Enzyme und Größenstandards mit Bezugsquelle oder Zusammensetzung.....	18
Tabelle 8: PCR Komponenten mit Bezugsquelle, Primer/Sonden mit Sequenz.....	18
Tabelle 9: Geräte mit Hersteller.....	19
Tabelle 10: Software mit Hersteller.....	20
Tabelle 11: Komponenten der HIV-1 spezifischen PCR.....	21
Tabelle 12: Ablauf der HIV-1 spezifischen PCR.....	21
Tabelle 13: Komponenten der HIV-1/CCR5 qPCR.....	22
Tabelle 14: Ablauf der HIV-1/CCR5 qPCR.....	23
Tabelle 15: Komponenten der HIV-1/CCR5 ddPCR.....	25
Tabelle 16: Ablauf der HIV-1/CCR5 ddPCR.....	25
Tabelle 17: Protokoll direkte Lyse.....	27
Tabelle 18: Kultivierte Zellarten und deren Eigenschaften.....	29
Tabelle 19: Antikörpermischungen und Anfärbung für eine Probe.....	33
Tabelle 20: Messung des CCR5 Plasmid mittels Nanodrop.....	35
Tabelle 21: Messung der Plasmid DNA mittels Qubit.....	40
Tabelle 22: Messung von genomischer DNA mittels Qubit.....	42
Tabelle 23: Zellzahlen der verschiedenen Subpopulationen nach Sortierung mittels FACS.....	49
Tabelle 24: DNA-Proben der Serokonverterstudie des RKI.....	51
Tabelle 25: Zellzahlen der einzelnen Subpopulationen pro Patient.....	53

1 Einleitung

1.1 HIV und AIDS

Im Jahre 1981 kam es in den USA zu einer ungewöhnlichen Häufung von opportunistischen Lungeninfektionen und malignen Hauttumoren (Karposi-Sarkome) bei jungen homosexuellen Männern [1]. Die Besonderheit lag darin, dass die Patienten zuvor als gesund eingestuft wurden und diese Krankheiten im Normalfall nur bei immunsupprimierten Menschen auftraten. Als Ursache konnte eine bis dahin unbekannte Immunschwäche ausgemacht werden, die 1982 unter dem Begriff „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ (AIDS) beschrieben wurde.

Die Arbeitsgruppe um Luc Montagnier des Institut Pasteur in Paris isolierte 1983 erstmals ein unbekanntes Retrovirus aus Blutproben eines AIDS-Patienten [2]. Der Erreger wurde 1984 von Robert Gallo als Auslöser der Krankheit beschrieben und erhielt im Jahre 1986 den Namen Humanes Immundefizienzvirus (HIV) [3]. Im gleichen Jahr wurde in Westafrika ein weiteres AIDS-auslösendes Virus entdeckt, welches den Namen HIV-2 erhielt [4].

30 Jahre später leiden nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation circa 36,7 Millionen Menschen an einer Infektion mit HIV [5]. Die Rate der Neuinfektionen lag im Jahr 2015 bei 2,1 Millionen Menschen und die Zahl der AIDS-assoziierten Todesfälle bei 1,1 Millionen. Somit stellen HIV und AIDS eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Zeit dar.

Seit der Entdeckung sind die weltweiten Bemühungen zur Bekämpfung des Virus enorm. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist eine HIV-Infektion jedoch unheilbar und mit einer lebenslangen Therapie verbunden. Mit der Entwicklung von antiretroviralen Medikamenten kam es zu einer drastischen Abnahme der Morbidität und Mortalität infizierter Patienten. Mit einer erfolgreichen Therapie kann die virale Replikation gehemmt und das Fortschreiten der Erkrankung hinausgezögert werden. HIV ist somit als eine chronische Erkrankung anzusehen und kein Todesurteil mehr. Jedoch bleibt auf Grund der Verfügbarkeit und den hohen Kosten vielen Menschen der Zugang zu Medikamenten verwehrt.

1.1.1 Die taxonomische Einteilung von HIV

HIV gehört zur Familie der Retroviren (*Retroviridae*) und ist der einzig humanpathogene Vertreter der Gattung *Lentiviren* [6]. Die taxonomische Einteilung kann der Abbildung 1 entnommen werden.

Bei den Retroviren handelt es sich um eine Virusfamilie von membranumhüllten Viren mit einem Genom aus zwei einzelsträngigen Ribonukleinsäuren (RNA) positiver Polarität [7]. Die charakteristische Eigenschaft der Vertreter dieser Familie ist die reverse Transkription. Bei dieser wird das RNA-Genom in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) umgeschrieben und im Anschluss in das Wirtsgenom integriert. Der Name der Retroviren leitet sich von dieser Eigenschaft ab.

Man unterscheidet zwischen exogenen und endogenen Retroviren, wobei erstere durch ihre Infektiösität von Individuum zu Individuum übertragen werden können. Die endogenen Retroviren werden in der Regel vertikal über die Keimbahn vererbt [8]. Aufgrund des Genomaufbaus unterscheidet man zusätzlich zwischen einfachen und komplexen Retroviren [7]. Das Genom eines einfachen Retrovirus ist aus den drei Genen *gag*, *pol* und *env* aufgebaut. Die komplexen Retroviren, wie HIV, besitzen außerdem weitere Gene für regulatorische und akzessorische Proteine.

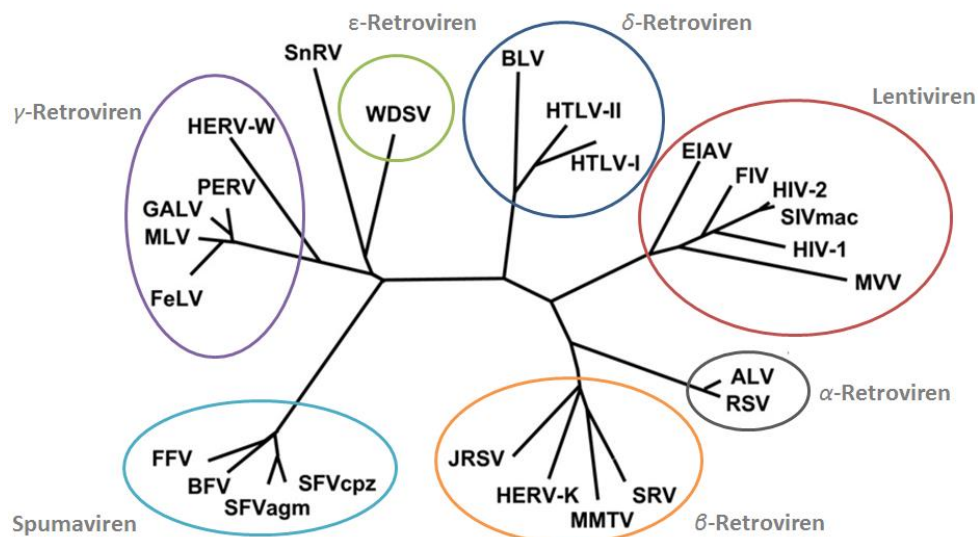


Abbildung 1: Taxonomie der Retroviren

Das *International Committee on Taxonomy of Viruses* teilt die Retroviren in die Unterfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae* ein. Die Spumaviren beinhalten nur den Genus der Spumaviren, die *Orthoretrovirinae* werden in α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, sowie *Lentiviren* eingeteilt [6]. Grafik modifiziert nach [9].

1.1.2 Der Ursprung von HIV

HIV-1 und HIV-2 sind auf die in Primaten endemischen Simianen Immundefizienz-Viren (SIV) zurückzuführen. Durch verschiedene Ursprünge weisen sie je nach Gen eine Sequenzhomologie zwischen 35% und 60% auf [10, 11]. Durch unabhängige zoonotische Transmissionen entstanden verschiedene HIV Linien, die nach dem heutigen Kenntnisstand HIV-1 in die Gruppen M (major), O (outlier), N (non-M/non-O) und P einteilen [12]. Während die Gruppen M und N offenbar von dem aus Schimpansen (*Pan troglodytes*) isolierten SIVcpz abstammen, liegt der Ursprung der Gruppen O und P in einem Retrovirus des Gorillas (*Gorilla gorilla*), dem SIVgor [13, 14]. Eine Einteilung von HIV-2 wird in die Gruppen A-H vorgenommen. Durch Sequenzvergleiche konnte das aus Rußmangaben (*Cercocebus atys*) isolierte SIVsm als die Quelle ausgemacht werden [15].

90% aller HIV-infizierten Individuen leiden an einer Infektion mit einem HIV-1 Virus der Gruppe M, somit kann dieses für die globale HIV-Epidemie verantwortlich gemacht werden. Innerhalb dieser Gruppe sind die neun Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K, sowie zusätzliche zirkulierende rekombinante Formen bekannt [12].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf HIV-1 Gruppe M Subtyp B gesetzt, da es sich um den vorherrschenden Subtyp innerhalb Nordamerikas und Europas handelt.

1.1.3 Virusmorphologie

Die HIV Virionen sind von sphärischer Geometrie mit einem Durchmesser von ca. 100 - 120 nm. Der Aufbau eines HIV-1 Partikels ist in Abbildung 2 dargestellt. Die äußere Hülle besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die bei der Knospung neuer Virionen von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet wird [16].

Die Hüllmembran ist mit dem transmembranen Glykoprotein gp41 (TM, 41 kDa) assoziiert, welches über nicht-kovalente Bindungen ein weiteres Glykoprotein, das gp120 (SU, 120 kDa), bindet [17]. Jeweils drei Moleküle TM und SU bilden sogenannte „Spikes“ [18]. Diese sind essentiell für die Initiation der Infektion einer Wirtszelle. Die Innenseite ist mit einer netzähnlichen Schicht aus dem Matrixprotein p17 (MA, 17 kDa) ausgekleidet, diese liegen als Trimere vor und verleihen den Virionen ihre Struktur [8].

Im Inneren befinden sich Lateralkörper und das Viruskapsid, welches bei HIV eine konische Form aufweist. Es ist über die Linkerproteine p6 (LI, 6 kDa) mit den Matrixproteinen verbunden. Das Kapsid besteht aus den Kapsidproteinen p24 (CA, 24 kDa) und bein-

haltet zwei einzelsträngige Nukleinsäuren, welche mit den Nukleokapsidproteinen p7 (NC, 7 kDa) assoziiert sind und einen Komplex bilden. Im Inneren befinden sich zusätzlich die Enzyme Reverse Transkriptase/RNaseH (RT/RH), Integrase (IN) und Protease (PR).

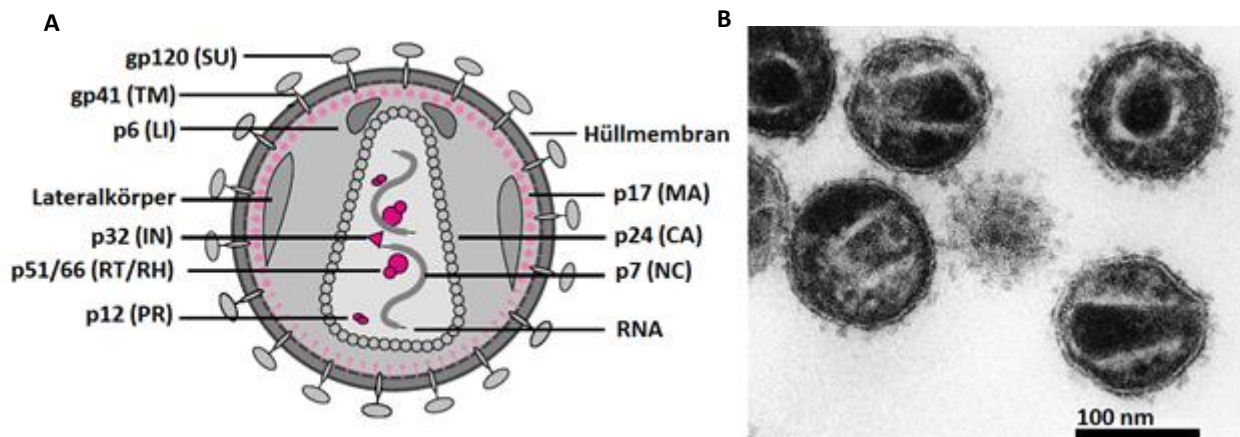


Abbildung 2: Morphologie des HIV-1 Viruspartikels

A) Hüllmembran mit Glykoproteinen gp41 (TM) und gp120 (SU), ausgekleidet mit Matrixprotein p17 (MA). Kapsid bestehend aus Kapsidprotein p24 (CA). Im Inneren zwei ssRNA komplexiert mit Nukleokapsidprotein p7 (NC), Lateralkörper, Linkerprotein p6 (LI), Integrase p32 (IN), Reverse Transkriptase p51 (RT) bzw. RNaseH p66 (RH) und Protease p12 (PR). Modifiziert nach [8]

B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV-1, Quelle: Hans R. Gelderblom/RKI

1.1.4 Genomaufbau und virale Proteine

Das Genom von HIV-1 besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen positiver Polarität mit einer Länge von circa 10 kB. Der Aufbau des Genoms ist in Abbildung 3 dargestellt. Die RNA weist durch eine 5'-Cap-Struktur und ein polyadenyliertes 3'-Ende die typischen Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Das Genom besteht aus neun offenen Leserahmen (ORF) und codiert für insgesamt 15 Proteine [19]. Zusätzlich zu den für Retrovirus typischen Produkten Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (Polymerase, Reverse Transkriptase, Protease, Integrase) und Env (Glykoproteine) werden die regulatorischen Proteine Rev (*regulator of virion proteins*), Tat (*transactivator of transcription*) und die akzessorische Proteine Nef (*negative factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein out*), sowie Vpu (*viral protein rapid*) codiert.

gag codiert für das Polyprotein pr55 (55 kDa), das durch die virale Protease in die Proteine MA, CA, NC und LI prozessiert wird [20]. Auch die Proteine des *pol*-Gens werden aus einem Vorläuferprotein prozessiert, dem pr160 (160 kDa). Es handelt sich hierbei um ein Gag/Pol-Fusionsprotein, dessen Synthese durch eine Verschiebung des ribosomalen Lese-

rasters der mRNA erreicht wird [21]. Dies ist in etwa 5% aller Translationen der Fall, so dass mehr Gag- als Gag/Pol-Proteine gebildet werden. So wird neben den Produkten des *gag*-Gens die gleichzeitige Translation der RT, IN und PR realisiert. Die viralen Glykoproteine werden durch das Gen *env* codiert, auch hier findet zunächst die Translation eines Vorläuferproteins statt, dem gp160 (160 kDa).

Die Synthese der regulatorischen und akzessorischen Proteine wird durch alternative Leserahmen und Splicing ermöglicht. Die Proteine Tat und Rev spielen eine essentielle Rolle bei der Regulation der Genexpression [22]. Nef, Vif, Vpr und Vpu sind nicht essentiell, steigern jedoch die Infektiosität von HIV und unterstützen die Freilassung neuer Virionen [23].

Die Strukturgene werden von Wiederholungssequenzen, den sogenannten Long-Terminals-Repeats (LTRs) flankiert. Diese bestehen aus den Regionen U3 (*unique*), R (*redundant*) und U5. Der 5'-LTR beinhaltet den viralen Promotor, die Terminationssequenz der Polymerase ist innerhalb der 3'-LTR lokalisiert [8].

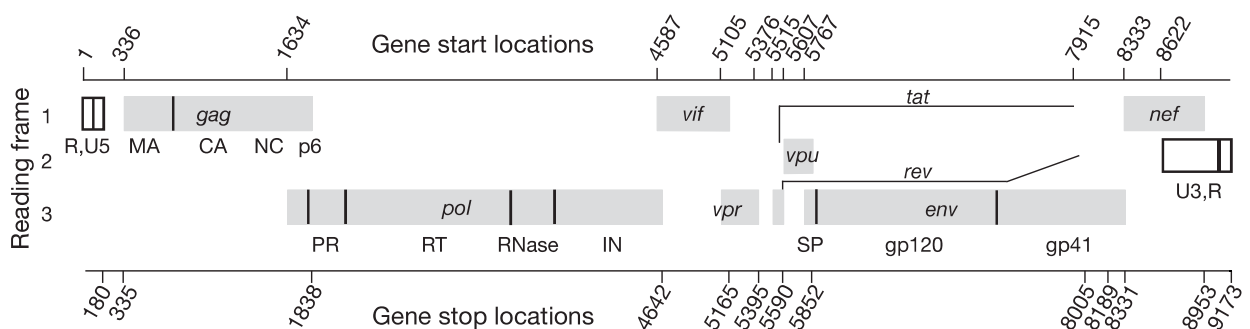


Abbildung 3: HIV-1 Genomorganisation

Die Long Terminal Repeats (LTR, weiß), bestehend aus U3/U5 und R, flankieren die Enden des Genoms. In Grau: ORF für Strukturgene *gag* (*group specific antigen*) mit Matrixprotein (MA), Capsidprotein (CA), Nukleokapsidprotein (NC) und Linkerprotein (p6, LI). Enzyme werden durch *pol* (Polymerase) codiert, mit Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), RNase und Integrase (IN). Gen für die Hüllproteine *env* mit gp120 und gp41. Leserahmen der Proteine Vif (*virion infectivity factor*), Vpr (*viral protein R*), Vpu (*virale protein u*), Nef (*negative factor*), Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of expression*) sind ebenfalls dargestellt. Start- und Stoppregnen der Gene sind gekennzeichnet. Grafik modifiziert nach [24].

1.1.5 Replikationszyklus

Eine Übersicht des HIV Replikationszyklus ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der Adsorption des Viruspartikels an spezifische zelluläre Rezeptoren. HIV nutzt das CD4-Protein als Hauptrezeptor, welches auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen wie T-Helferzellen, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen vorkommt. Es erfolgt zunächst eine Bindung des Glykoproteins SU an CD4, welche in einer Konformationsänderung des viralen Proteins resultiert und eine Interaktion mit einem Corezeptor ermöglicht. HIV bindet zusätzlich an den Chemokinrezeptor CXCR4 oder CCR5. Es kommt nach der Bindung zu weiteren Umlagerungen der Proteinstruktur, die es dem Virus ermöglichen mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle zu fusionieren. Dabei wird das HIV-Kapsid in das Zytoplasma entlassen. Es kommt im Anschluss zu einem Abbau der Kapsidstruktur (*Uncoating*) und der Bildung des Reversen-Transkriptase-Komplexes [25].

Im nächsten Schritt schreibt die RT die virale RNA in doppelsträngige DNA um. Die RNA dient dabei zunächst als Matrize für einen Minusstrang und wird im Anschluss durch die RNase-H Aktivität des Enzyms verdaut. Es kommt nun zur Bildung des sogenannten Präintegrationskomplexes (PIC), dieser besteht aus der viralen DNA, MA, der IN und dem Protein Vpr. Der PIC wird mit Hilfe von Vpr, den MA und zellulären Faktoren durch die Kernporen in den Zellkern transportiert. Dies ermöglicht auch die Infektion von ruhenden Zellen, eine Besonderheit der Lentiviren gegenüber anderen Retroviren [26]. Im Zellkern katalysiert die IN eine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom. Dazu wird die humane DNA geöffnet und mit dem Virusgenom verknüpft, dies wird durch die Endonuklease- und Ligaseaktivität des Enzyms ermöglicht. HIV-1 liegt nun als Provirus vor. Eine Integration findet vorwiegend in transkriptionsaktiven Regionen statt [27].

Abhängig von der Aktivität der Wirtszelle kommt es zu einer latenten Infektion oder zur Produktion neuer Virionen. Die Transkriptionsmaschinerie der Zelle übersetzt die provirale DNA in RNAs und die verschiedenen mRNAs zur Translation der viralen Proteine. In der frühen Expressionsphase werden vorwiegend mehrfach gespleißte mRNAs gebildet. Diese codieren beispielsweise für die regulatorischen Proteine Tat und Rev. In der späten Phase kommt es zur Expression von Volllängetranskripten [8]. Diese dienen zur Translation der benötigten Strukturproteine und als virale RNA in neuen Partikeln. Die Synthese der Env-Proteine findet am Endoplasmatischen Retikulum statt, die restlichen Virusproteine werden an freien Ribosomen im Cytoplasma translatiert.

Die Assemblierung der Virionen erfolgt an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und wird durch Gag-Proteine vermittelt [28]. Die Env-Proteine werden nach der Translation über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine rekrutieren die virale RNA und akkumulieren an speziellen Mikrodomänen der Membran. Durch eine Interaktion mit der ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) kommt es zu einer Abschnürung unreifer Virionen (*Budding*) [29]. Durch die proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine und der Ausbildung des konischen Kapsids kommt es zu einer Maturation zu infektiösen Partikeln.

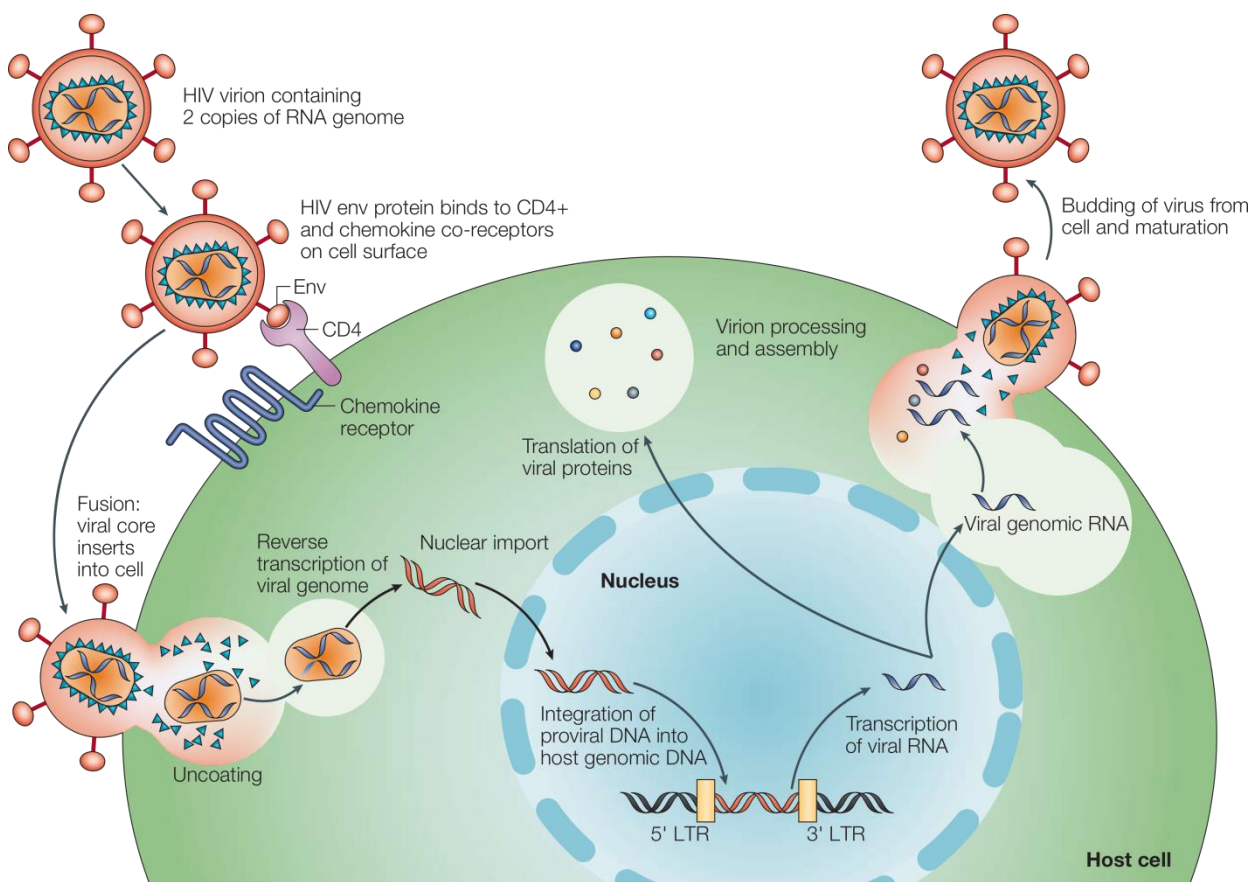


Abbildung 4: HIV Replikationszyklus

Bindung des Virus an CD4 und den Corezeptor. Anschließend Fusion des Viruspartikels mit der Wirtsmembran und Uncoating des viralen Kapsids. Im nächsten Schritt ist die reverse Transkription der viralen RNA dargestellt und der Transport in den Zellkern. Dort kommt es zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom. Anschließend Transkription, sowie Translation zur Erzeugung neuer Virionen, die von der Wirtsmembran abknospen. Abbildung nach [30].

1.1.6 Pathogenese

Eine Infektion mit HIV ist durch den Kontakt von infektiöser Körperflüssigkeit wie Blut, Sperma und Vaginalsekret mit offenen Wunden oder mukosalem Gewebe möglich. Dadurch bilden ungeschützter Sexualverkehr und die gemeinsame Nutzung von Spritzen beim Drogenkonsum die größten Risiken. Eine infizierte Mutter kann das Virus vor oder während der Geburt auf ihre Nachkommen übertragen, eine Infektion durch das Stillen eines Kindes ist ebenfalls möglich.

Die Zielzellen des Virus exprimieren das Glykoprotein CD4, sowie den Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4. Somit stellen die CD4⁺ T-Lymphozyten die wichtigsten Ziele von HIV dar. Bei der Übertragung über mukosales Gewebe stellen auch Makrophagen und dendritische Zellen erste Ziele dar [31]. Die Zellen transportieren das Virus zu den Lymphknoten, von dort aus kann es sich über den gesamten Organismus ausbreiten.

Der typische Verlauf einer HIV-Infektion ohne medikamentöse Therapie kann aus der Abbildung 5 entnommen werden. Die Pathogenese wird dabei in drei Phasen eingeteilt, die Primärinfektion, die klinische Latenz und AIDS. Die ersten Symptome der Primärinfektionsphase können schon wenige Tage bis sechs Wochen nach dem Risikokontakt auftreten. Diese Phase dauert in der Regel nicht länger als drei Monate an und ist durch eine sehr hohe Viruslast von bis zu 5×10^6 Kopien RNA/ml Blut gekennzeichnet, sowie einer Verminderung der CD4⁺ Zellen [32]. Patienten klagen häufig über das Krankheitsbild eines viralen Infekts, mit Symptomen wie Fieber, Schwitzen, Kopfschmerzen, Lymphknotenschwellungen [33]. Häufig verläuft die Primärinfektion aber auch asymptomatisch.

Das Immunsystem beendet die primäre Infektionsphase durch eine drastische Senkung der Viruslast. Es folgt eine symptomfreie Phase, die klinische Latenz, die mehrere Jahre andauern kann. Die Anzahl der Viren im Blut ist im Vergleich zur Primärinfektion reduziert. Es kommt jedoch zu einer kontinuierlichen Virusproduktion, vor allem in den lymphatischen Organen [34]. Eine Hyperaktivierung des Immunsystems und die ständige Zerstörung von Zellen durch das Virus, resultiert in einem erhöhten Umsatz von CD4⁺ Zellen und einer reduzierten Halbwertszeit von wenigen Tagen [35, 36]. Die Gesamtanzahl an CD4⁺ Zellen sinkt während dieser Phase kontinuierlich ab, zunächst kann der Organismus die Zerstörung der CD4⁺ Zellen noch kompensieren. Diese Fähigkeit nimmt jedoch im Laufe der Zeit ab. Es kommt zu einer langsam voranschreitenden Schädigung des Immunsystems.

In der dritten Phase kommt es zu einer rapiden Abnahme der CD4⁺ Zellen und einer starken Virusreplikation. Diese Phase ist oft durch Viren mit einem veränderten Rezeptortropismus von CCR5 zu CXCR4 gekennzeichnet [37]. Dadurch ist HIV in der Lage ein breiteres Spektrum an Zielzellen zu infizieren. Bei Patienten in dieser Phase der HIV-Infektion treten gehäuft opportunistische Infektionskrankheiten oder maligne Tumore wie Karposi-Sarkome auf. Der starke Abfall der CD4⁺ T-Zellen und das gehäufte Auftreten von Krankheiten, stellen die typischen Kriterien von AIDS dar. Der Tod tritt meist durch eine opportunistische Infektion ein.

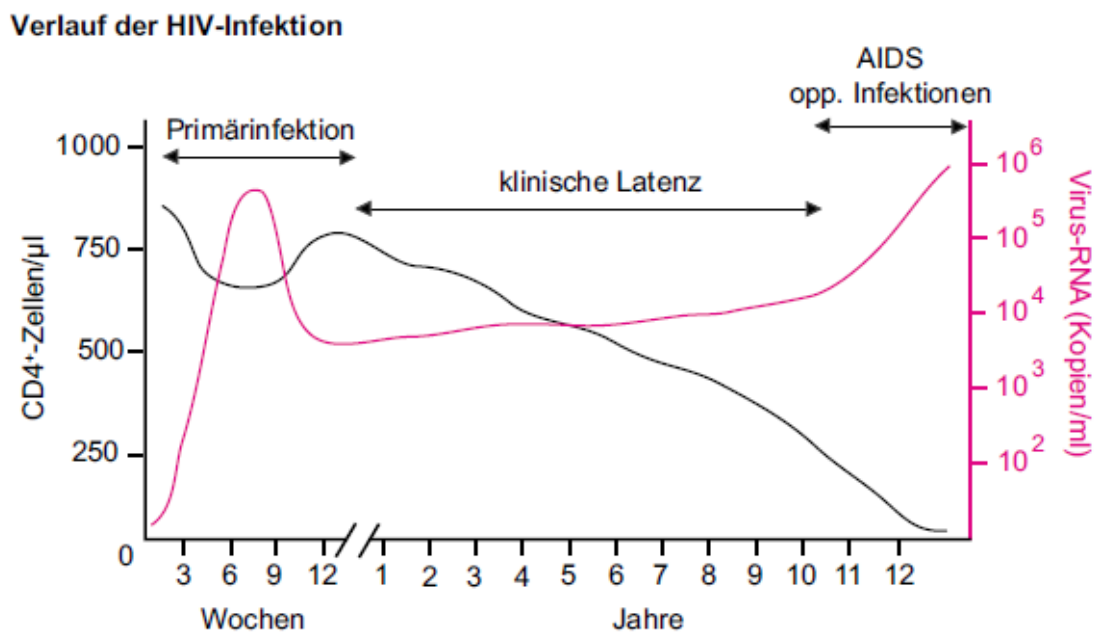


Abbildung 5: Verlauf einer HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie

Anzahl an CD4⁺-Zellen pro Mikroliter Blut im zeitlichen Verlauf einer Infektion (schwarz) und Anzahl der Kopien Virus-RNA pro ml Blut (rot). Die Infektion wird in die Stadien Primärinfektion, klinische Latenz und AIDS eingeteilt. Abbildung nach [2].

1.1.7 HIV-Therapie

Eine bestehende HIV-Infektion wird mit einer Kombination verschiedener Wirkstoffe behandelt, die eine Hemmung der viralen Replikation bewirken. Dies führt zu einer verminderten Infektiösität, zur Verzögerung der Krankheitsprogression und bei vielen Patienten auch zu einer Erholung des bereits geschädigten Immunsystems. Neben Inhibitoren der Reversen Transkriptase auf nukleosidischer (NRTI) oder nicht-nukleosidischer Basis (NNRTI), stehen auch Inhibitoren der Integrase (INI) und viralen Protease (PI) zur Verfügung [38]. Die NRTI werden neben den natürlichen Nukleotiden in den DNA-Strang eingebaut, was zu einer Kettenabbruchreaktion führt. NNRTI, INI und PI hemmen die Funktion des jeweiligen Enzyms. Bei der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) werden mindestens zwei verschiedene Hemmstoffe der Reversen Transkriptase mit einem Protease- oder Integrase-Inhibitor kombiniert. Dies verlangsamt die Entstehung von Resistenzen. Eine Therapie sollte laut Empfehlung der International AIDS-Society-USA bei allen Personen mit einer nachweisbaren Viruslast, unabhängig von der CD4-Zellzahl begonnen werden [39]. Eine erfolgreiche HAART resultiert bei vielen Patienten in der Verringerung der Viruslast unter 50 Kopien RNA/ml Blut, so dass diese mit den gängigen klinischen Methoden nicht mehr nachgewiesen werden kann [40].

1.1.8 Latente Virusreservoir

Eine vollständige Eradikation von HIV ist mit den heutigen Therapiekonzepten nicht möglich [41]. Eine große Barriere stellen latente Virusreservoir dar. Dabei handelt es sich um Zellen, die replikationskompetente Proviren beinhalten, jedoch keine aktive Virusproduktion vorweisen [42]. Diese infizierten Zellen werden somit weder von dem Immunsystem eliminiert, noch existiert ein Angriffsziel für antiretrovirale Medikamente. Bei einer Unterbrechung einer erfolgreichen HAART kann es auf Grund der Reaktivierung dieser Zellen zu einem Virusrebound kommen [43].

HIV Reservoir entstehen bereits in der primären Infektionsphase und können nach wenigen Tagen nachgewiesen werden [44]. Eine früh eingesetzte Behandlung kann die Entstehung nicht verhindern, wird jedoch assoziiert mit reduzierten Reservoir-Größen [45]. Das Reservoir mit der größten klinischen Relevanz stellen ruhende CD4⁺ T-Gedächtniszellen dar, deren Halbwertszeit zwischen 6 und 44 Monaten geschätzt wird [46, 47]. Somit würde eine Eradikation unter einer optimalen Langzeittherapie über 60 Jahre dauern.

1.2 T-Lymphozyten

Bei den T-Lymphozyten handelt es sich um antigen-erkennende Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie sind ein essentieller Bestandteil der zellulären Immunantwort und maßgeblich an der Regulation der humoralen Immunreaktion beteiligt.

T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und durchlaufen im Thymus verschiedene Stadien der Reifung. Dabei entstehen zwei Arten, die sich anhand ihres T-Zell-Rezeptors unterscheiden. Dieses Oberflächenprotein erkennt Antigene, die über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) präsentiert werden. Man unterscheidet zwischen $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen und $CD4^+$ T-Helferzellen.

Die cytotoxischen T-Zellen erkennen über den $CD8$ Rezeptor solche Antigene, die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Diese befinden sich auf der Oberfläche der meisten kernhaltigen Zellen [48]. Die T-Helferzellen hingegen, erkennen durch den $CD4$ Rezeptor Antigene über MHC-Klasse-II-Moleküle. Diese werden von antigenrepräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen exprimiert [49].

Nach der Reifung wandern die T-Lymphozyten als naive T-Zellen (T_N) in das lymphatische Gewebe. Durch Kontakt mit einem Antigen, kommt es zur Proliferation und Differenzierung zu T-Effektorzellen (T_E) [50]. Die Hauptaufgabe der $CD8^+$ T_E ist die Einleitung der Apoptose infizierter Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen differenzieren sich in verschiedene T_E , die auf Grundlage ihres Cytokinmusters unterschieden werden [51]. Diese haben unterschiedliche Funktionen, wie die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die Kontrolle der Autoimmunität oder auch die Immunsuppression [52]. Durch die Sezernierung verschiedener Cytokine, wird die Immunantwort auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Die Aktivierung von B-Zellen sorgt zudem für eine Produktion Antikörper.

Nach Eliminierung der Antigene sterben circa 95% der T-Effektorzellen ab, während sich die übrig gebliebenen zu langlebigen ruhenden T-Gedächtniszellen entwickeln [53]. Diese sind, durch den bereits erfolgten Kontakt, auf ein bestimmtes Antigen spezialisiert. So wird eine schnelle Immunreaktion bei erneuter Exposition gewährleistet.

1.2.1 Subtypen von T-Gedächtniszellen

T-Gedächtniszellen können aufgrund verschiedener Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen in Subtypen eingeteilt werden [54]. Diese unterscheiden sich neben den phänotypischen Eigenschaften, auch im Differenzierungsgrad und funktional. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Klassifizierung nach Mahnke *et al.* verwendet [55]. Diese sieht eine Einteilung in fünf Subtypen vor, welche in Abbildung 6 dargestellt ist. Weniger erforschte Subtypen, werden nicht berücksichtigt.

Nach Mahnke folgt die Differenzierung der Gedächtniszellen einer linearen Progression, die mit dem stufenweisen Verlust oder der Erlangung von Funktionen einhergeht. Die Proliferationsfähigkeit nimmt mit dem Differenzierungsgrad ab. Die Expressionsmuster der für diese Arbeit relevante Subtypen und Oberflächenmoleküle, werden in Tabelle 1 dargestellt.

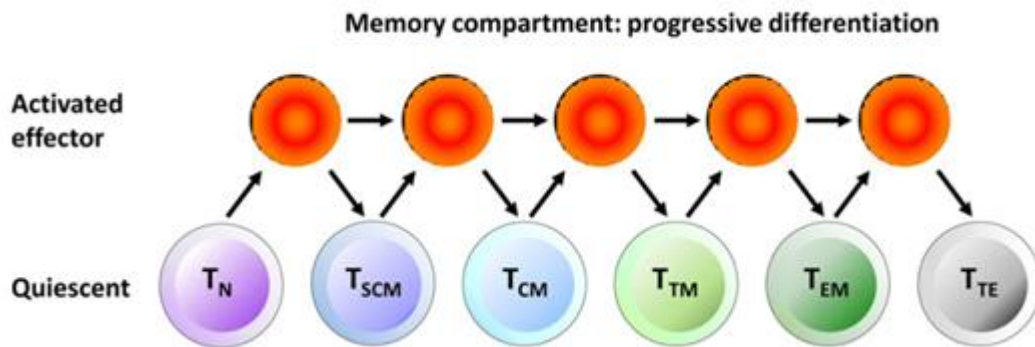


Abbildung 6: Subtypen der T-Gedächtniszellen und naive T-Zellen

T_N (naive T-cells), T_{SCM} (stem cell memory T cells), T_{CM} (central memory T cells), T_{TM} (transitional memory T cell), T_{EM} (effector memory T cells), T_{TE} (terminal effector memory T cell). Die Differenzierung folgt einem linearen Modell. Durch die Exposition mit einem Antigen kommt es zur Entwicklung von Effektorzellen. Nach Antigenklärung gehen die überlebenden Zellen in einen ruhenden Status über. Grafik aus [55].

Tabelle 1: Expression Oberflächenmarker durch naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen, basierend auf Mahnke *et al.*, Jaafoura *et al.* [55, 56]

Antigen	Funktion	T_N	T_{SCM}	T_{CM}	T_{TM}	T_{EM}
CD4	Bindung an Antigene über MHC-Klasse-II	+	+	+	+	+
CD45RA	Isoform von CD45, Tyrosin-Phosphatase	+	+	-	-	-
CD45RO	Isoform von CD45, Tyrosin-Phosphatase	-	-	+	+	+
CCR7	Homing – Lymphknoten, Stimulation B- und T-Zellen	+	+	+	-	-
CD95	Auslösung der Apoptose	-	+	+	+	+
CD62L	Homing - sekundären lymphatischen Organen	+	+	+	+	-
CD27	Kostimulation	+	+	/	/	/

Die T_N sind die Vorläufer der Gedächtniszellen, sie sind wenig ausdifferenziert und proliferieren in hohem Maße. Ein Unterschied zwischen T_N und dem Großteil der Subtypen von Gedächtniszellen ist die fehlende Expression von CD95. Erst nach der Aktivierung durch ein Antigen kommt es zur Hochregulation der Expression dieses Oberflächenproteins [57]. T_N exprimieren große Mengen des CD62L Antigens (L-Selektin) sowie CCR7, welche für die Wanderung dieser Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe zuständig sind (*Homing*) [58]. Gedächtniszellen können in CD62L⁺ oder CD62L⁻, sowie CCR7⁺ oder CCR7⁻ eingeteilt werden. Auf Grundlage dieser Heterogenität, wurden die Gedächtniszellen zunächst in zentrale T-Gedächtniszellen (*central memory T cells*, T_{CM}) und Effektor T-Gedächtniszellen (*effector memory T cell*, T_{EM}) eingeteilt [59]. Die T_{CM} wurden aufgrund der Lokalisierung in den sekundären lymphatischen Organen benannt. Eigenschaften dieser Zellen sind die Sezernierung großer Mengen an IL-2 und eine äußerst hohe Langlebigkeit [60]. Die Benennung der T_{EM} erfolgte aufgrund der Eigenschaft, eine rasche Effektorfunktion *ex-vivo* auszulösen [60]. Sie sezernieren hohe Mengen an Cytokinen, die einen raschen Einfluss auf das Immunsystem haben. Durch die fehlende Expression von CD62L und CCR7 kann eine Migration in peripheres Gewebe erfolgen. Untersuchungen der Telomere suggerieren, dass es sich bei T_{CM} um Vorgängerzellen von T_{EM} handelt [59]. T_{EM} sind im Vergleich kurzlebiger und exprimieren das CD27 Antigen.

Die stammzellähnlichen T-Gedächtniszellen (*stem cell memory T cell*, T_{SCM}) sind wenig ausdifferenziert und besitzen dieselben phänotypischen Eigenschaften wie T_N , exprimieren jedoch zusätzlich das CD95 Antigen. Sie sind der einzige Subtyp neben den T_N , der CD45RA statt CD45RO exprimiert. T_{SCM} sind in der Lage sich selbst zu erneuern und alle anderen Subtypen zu generieren [61]. Aus diesem Grund werden sie als stammzellähnliche T-Gedächtniszellen bezeichnet.

Die transitorischen T-Gedächtniszellen (*transitional memory T cells*, T_{TM}), werden von Mahnke *et al.* als ein weiterer Subtyp definiert [55]. Diese zeigen einen leicht höheren Differenzierungsgrad als T_{CM} und exprimieren weder CCR7, noch CD62L [62].

Die terminalen Effektor T-Gedächtniszellen (*terminal effector memory T cell*, T_{TE}) sind in hohem Maße ausdifferenziert und haben eine niedrige Proliferationskapazität. Sie besitzen die kürzesten Telomere unter allen Subtypen und zeigen eine Expression von CD45RA statt CD45RO [63, 64]. T_{TE} gehören hauptsächlich der CD8⁺ Fraktion der T-Lymphozyten an.

1.2.2 CD4⁺ T-Gedächtniszellen als latentes HIV-Reservoir

Aufgrund des Zelltropismus von HIV wird sich im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich auf CD4⁺ T-Lymphozyten beschränkt.

Die latent infizierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen stellen das am besten charakterisierte und wichtigste HIV-Reservoir bei therapierten HIV-Patienten dar. Es wurde erstmals 1995 von Chun *et al.* beschrieben [65].

Nach der Einführung der ersten antiretroviralen Medikamente, war die Hoffnung auf eine Heilung von HIV sehr groß. Diese wurde sehr schnell durch die Entdeckung der Existenz von latent infizierten, ruhenden CD4⁺ T-Zellen zerschlagen [66-68]. Denn trotz einer relativ geringen Größe, ist die klinische Relevanz dieses Reservoirs enorm, da es höchst stabil und sehr langlebig ist [69]. Eine Halbwertszeit von bis zu 44 Monaten, ermöglicht eine lebenslange Persistenz von HIV in einem infizierten Patienten unter HAART.

Eine latente Infektion kann in einer aktiven oder bereits ruhenden Zelle etabliert werden. Die Präintegrationslatenz ist jedoch auf Grund vieler Faktoren sehr ineffizient und führt meist nicht zu einer Integration des Virus in das Wirtsgenom [70]. Eine Postintegrationslatenz wird bereits in einer aktiven Zelle etabliert, welche im Anschluss in einen ruhenden Status übergeht [71]. Dies führt zu einer stabilen Integration der Provirus DNA in das Genom der Zelle.

Provirale HIV DNA konnten sowohl in Gedächtniszellen als auch in naiven T-Zellen nachgewiesen werden [72]. Die verschiedenen Eigenschaften der Subtypen der Gedächtniszellen könnten einen wesentlichen Einfluss auf die Persistenz von HIV haben. Aus diesem Grund ist die Charakterisierung des HIV-Reservoirs und das Verständnis von Mechanismen, die zur viralen Persistenz beitragen, essentiell für die Entwicklung von neuen Therapien und Eradikationsstrategien. Die Idee der Zerstörung des latenten Reservoirs ist längst Bestandteil neuer Therapiekonzepte. Der Nachweis proviraler DNA bietet zudem eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle des Infektionsstatus, da diese auch bei einer nicht detektierbaren Plasmavirämie, nachgewiesen werden können. Die Beobachtung des Reservoirs unter einer langanhaltenden antiretroviralen Therapie ermöglicht das Verständnis persistierender HIV-Infektionen.

1.3 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Optimierung und Etablierung geeigneter PCR-Methoden zur hochsensitiven Quantifizierung und Charakterisierung des proviralen HIV-1 Reservoirs in langzeitinfizierten Patienten unter HAART, sowie eine darauffolgende Analyse von Patientenmaterial.

Aus Vollblutproben sollen zunächst die CD4⁺ T-Gedächtniszellen isoliert und mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) in die Subpopulationen T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{TM} und T_{EM} sortiert werden. Innerhalb dieser Subpopulationen soll die HIV-1 DNA mittels PCR-basierter Methoden quantifiziert werden, um eine Aussage über das provirale Reservoir treffen zu können.

Im Zuge dieser Arbeit sollen zunächst einzelne Schritte der Probenvorbereitung optimiert werden.

Durch die niedrige Frequenz proviraler HIV-1 DNA in CD4⁺ T-Gedächtniszellen, spielt die Sensitivität der Quantifizierungsmethode eine überaus wichtige Rolle. Aus diesem Grund soll die Detektionsgrenze der genutzten quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) möglichst genau bestimmt werden, um auch eine Detektion weniger HIV-1 Kopien in einem hohen Hintergrund von genomischer DNA garantieren zu können.

Zusätzlich soll zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität eine HIV-1 spezifische nested-PCR zum hochsensitiven Nachweis von HIV-1 DNA etabliert und in den Workflow integriert werden. Vor der Analyse der eigentlichen Patientenproben soll dann der veränderte Ablauf mit *in vitro* infizierten PBMCs ausgetestet werden. Dies erlaubt zudem einen Vergleich mit dem bekannten Wissen über die Infektion von CD4⁺ T-Gedächtniszellen *in vivo*.

Im Anschluss soll eine Analyse von Vollblutproben aus langzeitinfizierten HIV-1 Patienten erfolgen.

Eine vielversprechende Methode zur Quantifizierung sehr niedriger Konzentrationen von DNA ist die digitale PCR. Da diese Methode keine Standardkurve erfordert, soll die Droplet Digital PCR (ddPCR) im Rahmen dieser Arbeit auf Eignung zur Quantifizierung von HIV-1 Proviren evaluiert werden.

2 Material

2.1 Antikörper und Mikrobeads

Tabelle 2: Antikörper und Mikrobeads mit Bezugsquelle

Material	Bezugsquelle
AG 3.0 Monoklonaler Antikörper	Dr. Norley, RKI
Anti-Human CCR7 PE-CF594	BD Bioscience, San Jose, USA
Anti-Human CD14	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD19	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD25 Alexa Flour 488	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD27	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD4 BV605	BioLegend®, San Diego, USA
Anti-Human CD45RA PE-Cyanine7	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD45RO eFlour 450	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD62 L	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD69 FITC	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Human CD8a FITC	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human CD95 APC	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human HLA-DR FITC	eBioscience®, San Diego, USA
Anti-Human IgG HRP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CD4 ⁺ T-cell antibody cocktail	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 ⁺ T-cell microbead cocktail	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
HIV-1 Poolserum	Dr. Norley, RKI
UltraComp eBeads®	eBioscience®, San Diego, USA

2.2 Biologisches Material

Tabelle 3: Biologisches Material mit Bezugsquelle

Material	Bezugsquelle
ACH-2 Zellen	NIH Aids Reagent Program , Germantown, USA
Buffy Coat (PBMCs)	DRK-Blutspendedienst, Berlin, Deutschland
C8166 Zellen	HPA Culture Collections, Salisbury, England
CCR5 Plasmid	Dr. Hohn, RKI
Cf2TH Zellen	ATCC® CRL-1430™, Manassas, USA
CrFK Zellen	ATCC® CCL-94™, Manassas, USA
EL-2 Zellen	ATCC® TIB-39™, Manassas, USA
HIV-1 _{Bal} (TCID50/ml: 1,3x10 ⁶)	NIH Aids Reagent Program, Germantown, USA
Inaktiviertes HIV-1	Dr. Norley, RKI
Patientenproben, Vollblut	Dr. Steinbeck-Klose, Berlin, Deutschland
pNL4-3 Plasmid	Dr. Hohn, RKI

2.3 Chemikalien, Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen mit Bezugsquelle

Material	Bezugsquelle
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl (0.84%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coulter Isoton II Diluent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (99.99%)	Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (0.5µg/ml)	Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver	Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ortho-Phenylendamin (OPD, 5 mg)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (2%)	Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PeqGold Universal-Agarose	VWR, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ (25%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Kits mit Bezugsquelle

Material	Bezugsquelle
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Scientific™, Waltham, USA

2.5 Medien und Zusätze

Tabelle 6: Medien und Zusätze mit Bezugsquelle

Material	Hersteller
DMEM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Rekombinantes Interleukin-2 (5x10 ⁴ Units/ml)	PreproTech® GmbH, Hamburg, Deutschland
Hyclone™ Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare, Logan, USA
Phytohemagglutinin (PHA, 5 mg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

2.6 Puffer, Enzyme und Größenstandards

Tabelle 7: Puffer, Enzyme und Größenstandards mit Bezugsquelle oder Zusammensetzung

Material	Bezugsquelle/Zusammensetzung
6x Ladepuffer	Thermo Scientific™, Waltham, USA
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific™, Waltham, USA
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	10mM NaH ₂ PO ₄ , 138mM NaCl, 2,7mM KCl
Proteinase K (20 mg/ml)	Thermo Scientific™, Waltham, USA
ELISA Assaypuffer	50 ml PBS, 2% Milchpulver, 0,5% Tween-20
ELISA Substratpuffer	12,5 ml Phosphat-Citrat-Puffer, 12 µl H ₂ O ₂ , 5 mg OPD
ELISA Waschpuffer	1,5 l PBS (1x), 0,05% Tween-20
FACS-Puffer	eBioscience®, San Diego, USA
ICS-Fixierungspuffer	eBioscience®, San Diego, USA
Lysepuffer	200 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
MACS®-Puffer	PBS (1x), 0,5% BSA, 2mM EDTA
Phosphat-Citrat-Puffer	PeproTech® GmbH, Hamburg, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50x)	Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.7 PCR Komponenten

Alle innerhalb dieser Arbeit genutzten Primer wurden von Invitrogen bezogen. Die genutzten Sonden wurden von TIBMolBio hergestellt.

Tabelle 8: PCR Komponenten mit Bezugsquelle, Primer/Sonden mit Sequenz

Material	Bezugsquelle/Zusammensetzung
ddPCR™ Supermix for Probes (2x)	BioRad, Hercules, USA
ddPCR™ Droplet Generation Oil	BioRad, Hercules, USA
dNTPs (25mM)	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific™, Waltham, USA
MgCl ²⁺ (25mM)	Thermo Scientific™, Waltham, USA
PCR-Puffer (10x)	Thermo Scientific™, Waltham, USA
TaqMan® Universal Master Mix II (2x)	Applied Biosystem, Waltham, USA
Primer/Sonde	Sequenz 5'-3'
CCR5 forward (Malnati <i>et al.</i> , [73])	ATGATTCTGGGAGAGACGC
CCR5 reverse (Malnati <i>et al.</i> , [73])	AGCCAGGACGGTCACCTT
CCR5 Sonde (Malnati <i>et al.</i> , [73])	HEX-AACACAGCCACCACCCAAGTGATCA-BHQ1
Gag 84 reverse (Palmer <i>et al.</i> , [74])	TGCTTGATGTCCCCCACT
HIV-1 forward (Malnati <i>et al.</i> , [73])	TACTGACGCTCTCGCACC
HIV-1 reverse (Malnati <i>et al.</i> , [73])	TCTCGACGCAAGGACTCG
HIV-1 Sonde (Malnati <i>et al.</i> , [73])	FAM-CTCTCTCTTCTAGCCTC-MGB
LTR 625 forward (RKI)	ATCTCTAGCAGTGGCGC

2.8 Geräte

Tabelle 9: Geräte mit Hersteller

Material	Hersteller
15-R Zentrifuge	Thermo Scientific™, Waltham, USA
4K15 Zentrifuge	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5424 Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bright-Line™ Hämozytometer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CoulterCounter® Z2 Partikelzähler	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
DG8™ Cartridge Holder	Bio-Rad, Hercules, USA
DNAEngine® Thermozykler	Bio-Rad, Hercules, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACSAria II™	BD Bioscience, San Jose, USA
Geldokumentationssystem	PHASE GmbH, Lübeck, Deutschland
Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
HeraCell™ 240 Zellinkubator	Thermo Scientific™, Waltham, USA
IKAMAG® RCT Magnetrührer	IKA®, Staufen, Deutschland
LSR II Flow Cytometer	BD Bioscience, San José, USA
MACS® Midi	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Nanodrop® 1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Nunc Flow AURA PCR (Sterilbank)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
PG 5002-S Delta Range (Waage)	Mettler-Toledo GmbH, Wien, Österreich
Pipettboy 2	Integra Bioscience, Hudson, USA
PowerPac™ Basic (Strom, Gelelektrophorese)	Bio-Rad, Hercules, USA
Plate Sealer	Thermo Scientific™, Waltham, USA
QX200 Droplet Generator	Bio-Rad, Hercules, USA
QX200 Droplet Reader	Bio-Rad, Hercules, USA
Qubit™ 3.0 Fluorometer	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Sprout Tischzentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Stratagene MX3005P qPCR System	Stratagene, San Diego, USA
Sub-Cell® Model 192 (Gelelektrophorese)	Bio-Rad, Hercules, USA
TecanReader Sunrise™ Plattenlesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermo HeraSafe™ Sterilbank	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Thermomixer® Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vacusaft™	Integra Bioscience, Hudson, USA
VortexGenie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland

2.9 Software

Tabelle 10: Software mit Hersteller

Material	Hersteller
DNASTAR® Lasergene Suite	DNASTAR Inc., Madison, USA
EasyReader (ELISA Auswertung)	Dr. Norley, RKI
FireCam Control	PHASE GmbH, Lübeck, Deutschland
FlowJo®	FlowJo LLC, Ashland, USA
Geneious	Biomatters, San Francisco, USA
Microsoft®Office	Microsoft, Redmond, USA
MxPro ET Software	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
NanoDrop® ND-1000	Molecular Dynamics/ Amersham Bioscience
Quantasoft™	Bio-Rad, Hercules, USA
RStudio	RStudio Inc, Boston, USA
AmplifX	Nicolas Jullien

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen [75].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine PCR mit den in der Tabelle 11 aufgelisteten Komponenten durchgeführt. Diese PCR amplifiziert eine Sequenz innerhalb des 5'-LTR beziehungsweise 5'-UTR *gag* und der *gag*-Region von HIV-1.

Tabelle 11: Komponenten der HIV-1 spezifischen PCR

Komponente	Menge	Konzentration
	<i>pro Reaktion</i>	<i>final</i>
10x Hot Start PCR Puffer (ohne MgCl ₂)	2,5 µl	1x
Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase (5 Units/µl)	0,2 µl	1 Unit
dNTP Mix (2,5mM pro dNTP)	0,2 µl	0,02 mM
Forward Primer (10 µM)	1 µl	400 nM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	400 nM
MgCl ₂ (20 mM)	2 µl	2 mM
H ₂ O bidest.	add 25 µl	-
Template DNA	bis 10 µl	50 bis 660 ng

Die PCR erfolgte in der DNAEngine von Bio-Rad mit dem in Tabelle 12 dargestellten Verlauf.

Tabelle 12: Ablauf der HIV-1 spezifischen PCR

Schritt	Phase	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	4 Minuten
2	Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3	Annealing	57 °C	30 Sekunden
4	Elongation	72 °C	1 Minute
5	gehe zu Schritt 2, 19x – 35x	-	-
6	Finale Elongation	72 °C	5 Minuten
7	Ende	4 °C	∞

3.1.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die qPCR fundiert auf dem gleichen Prinzip wie eine konventionelle PCR, erlaubt jedoch zusätzlich die Quantifizierung der vervielfältigten DNA. Diese erfolgt durch den Einsatz von sequenzspezifischen fluoreszenz-markierten DNA-Sonden, die sich während der Annealingphase zusätzlich zu den Primern an die Einzelstränge anlagern. In dieser Arbeit wurden sogenannte TaqMan® Sonden genutzt, die am 3'-Ende mit einem Quencher und am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (FAM) oder Hexachlorfluorescein (HEX) versehen sind. Bei einer intakten Sonde, wird die Fluoreszenz auf den Quencher übertragen und somit eine Emission verhindert. Während der Elongationsphase werden sowohl Quencher als auch der fluorige Farbstoff durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase von der Sonde entfernt, wodurch die Fluoreszenz der Probe proportional zur Menge der DNA ansteigt [76]. Die emittierte Fluoreszenz wird nach jeder Elongationsphase ermittelt. Mit Hilfe eines passiven Referenzfarbstoffes, hier X-Rhodamin (ROX), wird das Signal normalisiert.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde eine Duplex-qPCR genutzt, die eine parallele Quantifizierung des Gens für den CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) und der DNA von HIV-1 Gruppe M Subtyp B erlaubt. CCR5 wird durch ein Single-Copy Gen codiert, welches die Quantifizierung der in der Probe vorliegenden Genomäquivalente erlaubt. Die HIV-1/CCR5 qPCR wurde im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit etabliert und stellt einen Zusammenschluss zweier Singleplex-qPCR zur Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 nach dem Protokoll von Malnati *et al.* dar [73]. Für die Analysen wurde der in Tabelle 13 dargestellte Ansatz genutzt.

Tabelle 13: Komponenten der HIV-1/CCR5 qPCR

Komponente	Menge <i>pro Reaktion</i>	Konzentration <i>final</i>
TaqMan® Universal Master Mix II (2x)	12,5 µl	1x
CCR5 Forward Primer (10 µM)	0,5 µl	200 nM
CCR5 Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl	200 nM
CCR5 Sonde (10 µM)	0,5 µl	200 nM
HIV-1 Forward Primer (10 µM)	0,75 µl	300 nM
HIV-1 Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl	300 nM
HIV-1 Sonde (10 µM)	0,3 µl	120 nM
H ₂ O bidest.	add 25 µl	-
Template DNA	bis 8 µl	1 bis 660 ng

Innerhalb dieser Arbeit wurde zudem ein Ansatz zur alleinigen Quantifizierung von CCR5 genutzt. Dieser ergibt sich durch den Ersatz der HIV-1 Primer und Sonde mit H₂O bidest. Alle anderen Komponenten, sowie der Ablauf sind identisch mit der HIV-1/CCR5 qPCR.

Die qPCR erfolgten im Stratagene Mx3005P System von Agilent Technologies, nach dem in Tabelle 14 dargestellten Verlauf.

Tabelle 14: Ablauf der HIV-1/CCR5 qPCR

Schritt	Phase	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 Minuten
2	Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3	Annealing und Elongation	60 °C	1 Minute
5	gehe zu Schritt 2, 45x	-	-

Die Quantifizierung erfolgte mit einer Referenzstandardkurve, die zwei Plasmide mit den Sequenzen für CCR5 und HIV-1 enthielt (5×10^5 bis 5×10^{-1} Kopien/ μ l, zehnfach Verdünnungsschritte). Für die alleinige Quantifizierung von CCR5 stand eine Referenzstandardkurve zur Verfügung, die ausschließlich das CCR5 Plasmid enthielt (2×10^5 bis 2×10 Kopien/ μ l). Zur Analyse wurde für jede Probe ein Wert ermittelt, an dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert, den *Cycle Threshold* (C_T), überschreitet. Mit den C_T -Werten der Standardkurve und der in jedem Verdünnungsschritt eingesetzten Menge, wurde eine Geradengleichung erstellt, mit deren Hilfe die initial eingesetzte Kopienzahl der Proben ermittelt wurde. In jedem qPCR Ansatz wurden zusätzlich mehrere Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Die Analyse erfolgte mit der *MxPro* Software von Agilent Technologies. Alle Analysen wurden in mindestens zwei Replikaten durchgeführt.

3.1.3 Nested Polymerase-Kettenreaktion

Bei der nested-PCR handelt es sich um zwei ineinander verschachtelte PCR-Läufe. Während der ersten PCR (out-PCR) wird ein Fragment mit einem äußeren Primer-Paar amplifiziert. Das Produkt der out-PCR dient der nachgeschalteten zweiten PCR (in-PCR) als Template. Die Bindungsstellen der Primer liegen dabei innerhalb des ersten Amplikons.

In dieser Arbeit wurde die in Abschnitt 2.2.1 geschilderte konventionelle PCR mit der in Abschnitt 2.2.2 geschilderten qPCR zu einer nested-PCR vereint.

Für die in-PCR wurden 2,5 µl des Produktes der out-PCR als Template eingesetzt. Die out-PCR wurde mit 19 Zyklen angesetzt.

3.1.4 Digitale Polymerase-Kettenreaktion

Bei der digitalen PCR handelt es sich um eine Methode zur absoluten Quantifizierung von DNA. Bei dieser wird die DNA vor der Amplifikation in viele, kleine Kompartimente aufgeteilt. Eine Strategie ist die Erzeugung von winzigen Öl-Tropfen, welche die DNA einschließen und als Raum für die Reaktion dienen. Dabei werden sowohl Tropfen erzeugt, die kein Template beinhalten, als auch solche, die eins oder mehrere Moleküle einschließen. Die anschließende Amplifikation findet nur in solchen Kompartimenten statt, die auch Ziel-DNA beinhalten. Die Zugabe der in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen fluoreszenz-markierten DNA-Sonden erlaubt eine Fluoreszenzentwicklung in den Tröpfchen, die amplifizierbare DNA enthalten. Die Analyse erfolgt durch eine Endpunktbestimmung, bei welcher positive und negative Tropfen quantifiziert werden. Die Quantität der initial eingesetzten DNA-Kopien, kann durch die in Gleichung (1) beschriebene Poisson-Statistik ermittelt werden [77].

$$\lambda = -\ln(1 - p) \quad (1)$$

λ – Mittelwert Kopien per Reaktion, p – positive Reaktionen/Anzahl Reaktionen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die ddPCR Technologie von Bio-Rad genutzt. Der in 3.1.4 vorgestellte Assay zur parallelen Quantifizierung von CCR5 und HIV-1 wurde auf die ddPCR angepasst. Die Verteilung der DNA erfolgte durch die Erzeugung einer Wasser-Öl-Emulsion in bis zu 2×10^4 Tropfen mit einem Volumen von 1 nl, mit dem QX200 Droplet Generator von Bio-Rad. Es wurde der in Tabelle 15 dargestellte Ansatz genutzt.

Tabelle 15: Komponenten der HIV-1/CCR5 ddPCR

Komponente	Menge <i>pro Reaktion</i>	Konzentration <i>final</i>
ddPCR™ Supermix (2x)	11,25	1x
CCR5 Forward Primer (20 µM)	1	900 nM
CCR5 Reverse Primer (20 µM)	1	900 nM
CCR5 Sonde (10 µM)	0,45	200 nM
HIV-1 Forward Primer (20 µM)	1	900 nM
HIV-1 Reverse Primer (20 µM)	1	900 nM
HIV-1 Sonde (10 µM)	0,45	200 nM
H ₂ O <i>bidest.</i>	add 22,5	-
Template DNA	bis 6,35 µl	1 – 330 ng
Droplet Generation Oil	70	-

Nach der Erzeugung der Tröpfchen wurden pro Probe 40 µl der Emulsion in eine 96-Well Platte transferiert. Die PCR erfolgte mit der DNAEngine von Bio-Rad mit dem in Tabelle 16 dargestellten Verlauf.

Tabelle 16: Ablauf der HIV-1/CCR5 ddPCR

Schritt	Phase	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 Minuten
2	Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3	Annealing und Elongation	60 °C	1 Minute
5	gehe zu Schritt 2, 40x	2 °C/sec	-
6	Stabilisierung der Droplets	98 °C	10 Minuten

Die Auslese der Droplets erfolgte mit dem QX200 Droplet Reader und die Analyse der Ergebnisse mit der QuantaSoft Software von BioRad. Alle Analysen wurden in Duplikaten durchgeführt.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein analytisches Trennverfahren für Nukleinsäuren. Dabei wandern die negativ geladenen Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Agarosegel, wodurch sie der Größe nach aufgetrennt werden. Durch diese Methode kann eine Größenbestimmung von DNA-Sequenzen realisiert werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Auswertung von konventionellen PCRs genutzt. Um ein 1% Agarosegel herzustellen, wurden 1 g Agarosepulver in 100 ml 1x TAE-Puffer für einige Sekunden aufgekocht. Zur Anfärbung der DNA wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das Gel wurde anschließend in eine Gelkammer gegossen und abgekühlt. Jeweils 20 µl der zu analysierenden DNA wurden mit 5 µl Ladepuffer versetzt. Nach Aushärtung wurden ein Größenstandard und die Proben in die geformten Gel-taschen pipetiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 85 V für 60 Minuten.

Die Analyse erfolgte in einer Geldokumentationsanlage mit Hilfe von UV-Licht.

3.1.6 Herstellung von Plasmidstandardreihen

Die Herstellung von Plasmidstandardreihen erfolgte nach dem Protokoll von Malnati *et al.* [73]. Alle hergestellten Standardreihen basierten auf zehnfachen Verdünnungen der Plasmide pNL4-3 und pCR-4 mit CCR5 Insert. Die Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurde zunächst mit einem Qubit 2.0 Fluorometer oder einem Nanodrop gemessen. Mittels Gleichung (2) wurde die Teilchendichte ausgerechnet. Die Plasmide wurden im Anschluss auf die gewünschte Anfangskonzentration für die Herstellung der Standardreihe verdünnt.

$$n_i = \frac{N_A * c}{M} \quad (2)$$

n_i – Teilchendichte [Moleküle/µl], N_A – Avogadro-Konstante ($6 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), c – Konzentration [g/µl],

M – Molekulargewicht [g/mol]

Um eine Duplex-Standardreihe herzustellen, wurde für jede gewünschte Verdünnungsstufe 900 µl H₂O bidest. in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße vorgelegt. Für die erste Verdünnungsstufe wurde ein Volumen von 800 µl benötigt, da jeweils 100 µl beider Plasmidlösungen überführt wurden. Das Gefäß wurde im Anschluss 30 Mal invertiert und zunächst 5 Minuten bei 56 °C inkubiert, danach erfolgte eine Abkühlung für 1 Minute auf Eis. Für jeden wei-

teren Verdünnungsschritt wurden 100 µl der vorherigen Lösung in 900 µl H₂O bidest. überführt und das oben geschilderte Prozedere wiederholt.

Die Effizienz E einer Standardreihe kann mittels Gleichung (3) berechnet werden.

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} - 1 \quad (3)$$

3.1.7 DNA-Isolationsmethoden

Für die normale Isolation und Aufreinigung von DNA aus Zellen wurde das QIAamp DNA Mini Kit genutzt. Die Extraktion erfolgte dabei nach dem Herstellerprotokoll für kultivierte Zellen.

Dazu wurden zunächst pro Ansatz maximal 5×10^6 Zellen mit 20 µl Proteinase K und 200 µl des beigefügten Lysepuffers für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Dies diente dem Aufschluss der Zellen. Im Anschluss wurde die DNA zur Fällung mit 200 µl Ethanol (96%) versetzt. Die Lösung wurde dann in ein Zentrifugationsgefäß mit DNA-absorbierender Silica-Gel-Membran überführt. Es folgten drei Zentrifugations- und zwei Waschschrte mit beigefügten Waschpuffern. Im Anschluss wurde die DNA mit 200 µl H₂O bidest. eluiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Lyse von fixierten Zellen, wurde eine direkte Lysemethode als Alternative genutzt. Diese Methode erfolgte nach einem angepassten Protokoll von Behrendt *et al.*, welches aus Tabelle 17 entnommen werden kann [78]. Zum Proteinase K Verdau wurden die Zellen in 40 µl Lysepuffer mit 0,2 mg/ml Proteinase K resuspendiert.

Tabelle 17: Protokoll direkte Lyse

Schritt	Temperatur	Zeit
Frieren	-80 °C	20 Minuten
Tauen	60 °C	5 Minuten
3 Wiederholungen		
Proteinase K Verdau	55 °C	3 Stunden
Proteinase K Inaktivierung	95 °C	30 Minuten

Isolierte DNA wurde, falls nicht anders angegeben, mittels Nanodrop quantifiziert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 18 aufgelisteten Zellen in Kultur genommen. Die Kultivierung erfolgte stets in einem Heracell™ 240 CO₂-Inkubator von Thermo Fisher Scientific, bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %, sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit bis 95 %. Als Kulturgefäße dienten TPP Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 25 bis 150 cm².

Je nach Zellart fand die Kultivierung in Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI-1640) oder Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) statt. Die Medien wurden zusätzlich mit 10-20 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt. Das Medium zur Kultur von PBMCs wurde zusätzlich mit rekombinantem IL-2 versetzt.

Da das Wachstum von immortalisierten Zelllinien von Platz und Angebot der Nährstoffe abhängt, mussten diese zweimal wöchentlich verdünnt und mit neuem Medium versorgt werden. Vor jeder Subkultur wurde die Population mit einem Auflichtmikroskop auf Kontaminationen überprüft.

Subkultur Suspensionszellen

Zur Subkultur von Suspensionszellen wurden zunächst mögliche Aggregate durch auf- und abpipetieren aufgelöst. Im Anschluss wurde ein Großteil des Mediums mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die Flasche wurde dann mit frischem Medium auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt.

Subkultur adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden zunächst durch einen proteolytischen Verdau der Adhäsionsproteine vom Flaschenboden gelöst. Dazu wurden diese zunächst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin übernetzt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen konnten in 5 ml Medium aufgenommen werden. Davon wurden 9 ml verworfen, der Rest wurde bis auf 20 ml aufgefüllt.

Die Zellkulturversuche wurden im S3** Labor unter sterilen Bedingungen in geeigneten Sterilbänken mit laminarer Luftströmung durchgeführt.

Tabelle 18: Kultivierte Zellarten und deren Eigenschaften

Zellen	Zelltyp	Medium	Wachstums- charakteristik	Subkultur	Relevante Besonderheit
ACH-2	Immortalisierte humane T-Zelllinie	RPMI-1640 10 % FKS 1 % Pen/Strep	Suspension	1:8	1 Kopie HIV-1 pro Zelle
C8166	Immortalisierte humane T-Zelllinie	RPMI-1640 10 % FKS 1 % Pen/Strep	Suspension, in Aggregaten	1:6	-
Cf2TH	Immortalisierte Canine Thymuszellen	DMEM 10 % FKS 1 % Pen/Strep	Adhärenz	1:6	-
CrFK	Immortalisierte feline Nierenzellen	DMEM 10 % FKS 1 % Pen/Strep	Adhärenz	1:10	-
EL-4	Immortalisierte murine T-Zelllinie	RPMI-1640 10 % FKS 1 % Pen/Strep	Suspension	1:6	
PBMCs	Humane mononukleare Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten, Monozyten)	RPMI-1640 20 % FKS IL-2	Suspension	-	-

3.2.2 Herstellung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellpellets wurden die Kulturen abgeerntet, gegebenenfalls fixiert und mittels Coulter Counter gezählt. Im Anschluss wurde die Suspension auf die gewünschte Menge verdünnt und aliquotiert. Zum Pelletieren wurde die Suspension bei 300g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Eine Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 Ficoll-Hypaque Zentrifugation

Zur Isolierung von PBMCs aus Vollblutproben wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque durchgeführt. Zur Aufreinigung wurden 15 ml Ficoll-Hypaque in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dann vorsichtig mit dem Blut überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1400g für 25 Minuten ohne Bremse. Ficoll-Hypaque ist ein stark verzweigtes Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Demnach hat es eine niedrigere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, jedoch eine höhere als PBMCs und Thrombozyten. Somit bildete das Plasma nach der Zentrifuga-

tion die oberste Schicht und die PBMCs die Interphase zwischen Plasma und Ficoll. Diese Schicht wurde vorsichtig aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die gewonnenen Zellen mit 50 ml PBS gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 800g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml 0.84 % NH_4Cl resuspendiert. Eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad diente der Lyse der restlichen Erythrozyten. Darauf folgte ein erneuter Waschschrift mit den zuvor genannten Schritten. Das gewonnene Pellet wurde in 50 ml PBS resuspendiert und für 12 Minuten bei 200g zentrifugiert, dieser letzte Zentrifugationsschritt separiert die restlichen Thrombozyten von den PBMCs. Nach Verwurf des Überstandes wurden die aufgereinigten Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und durch einen 40 μm Filter gefiltert.

3.2.4 Infektion von PBMCs mit HIV-1

Zunächst wurden 1×10^8 PBMCs in PBS für 10 Minuten bei 300g abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 10 ml RPMI-1640 mit 20% FKS (R20) resuspendiert. Zur Aktivierung der Zellen wurden dem Medium 10 μl PHA beigefügt und vermischt, es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C Grad im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken. Die PBMCs wurden dann in zwei Zellkulturflaschen mit 45 ml R20 überführt und für 4 Tage unter den in Punkt 3.2.1 geschilderten Konditionen kultiviert.

Die Infektion erfolgte mit dem primären HIV-1 Isolat HIV-1_{BAL}. Die Zellen aus beiden Kulturflaschen wurden zunächst in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PBMCs in 300 μl Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden zwei Zellkulturflaschen mit IL-2 versetztem R20 vorbereitet. Ein Teil der Zellen wurde direkt in eine der Flaschen überführt.

Der zweite Teil wurde mit 500 μl der Virussuspension versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal mit 20 ml Medium gewaschen und dann 10 Minuten bei 300g abzentrifugiert. Die infizierten PBMCs wurden anschließend in die zweite Kulturflasche überführt und für 3 Tage inkubiert.

Für jeden Tag der Infektion wurde eine 250 μl Probe des Mediums abgenommen. Diese wurde bei 2500g für 5 Minuten zentrifugiert und 200 μl des Überstandes für ein p24-ELISA bei -20 °C eingefroren.

3.2.5 Zellfixierung

Die Zellen wurden zunächst bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die gewonnenen Pellets wurden dann in 500 µl PFA (2 %) resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das PFA wurde durch zwei Waschschriffe mit 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation ausgewaschen. Die Zellen wurden dann zur weiteren Verarbeitung in PBS aufgenommen.

3.2.6 p24 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der p24 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (p24 ELISA) ist ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis von HIV-1 Kapsidproteinen. Freies Antigen bindet sich dabei an eine mit Antikörpern beschichtete Platte. Das gebundene Antigen wird durch einen Primärantikörper detektiert, welcher wiederum mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper markiert wird. Durch eine Reaktion des Enzyms (Meerrettichperoxidase) mit Wasserstoffperoxid und Orthophenylendamin kann die Präsenz der Antigene kolorimetrisch detektiert werden.

Zunächst wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit dem in der Abreitsgruppe etablierten monoklonalen Fängerantikörper AG 3.0 beschichtet. Dieser wurde dazu in einem Verhältnis von 1:1000 mit Bicarbonatpuffer verdünnt und dann zu je 50 µl in die Wells pipetiert. Im Anschluss wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zunächst in einem Becherglas mit Waschpuffer dreimal gewaschen. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden im Anschluss freie Proteinbindungsstellen mit PBS-Milch (2% Milchpulver in 1x PBS) abgeblockt. Dazu wurden je 200 µl in die Wells pipetiert und dann für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Proben mit Tween versetzt (Endkonzentration 0.2 %) und für 10 Minuten bei 25 °C inaktiviert. Es folgte ein weiterer Waschschriff der Platte. Zur Titration der Proben und einer Standardkurve, wurde zunächst 50 µl Assaypuffer pro Well vorgelegt. Die inaktivierten Proben wurden nun sechsfach, der p24 Standard zehnfach in einem Verhältnis von 1:2 titriert. Die anschließende Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C. Es folgten drei weitere Waschschriffe der Platte. Der primäre Antikörper (HIV Pool Serum) wurde vor dem Auftragen 1:10000 mit Assaypuffer verdünnt und dann zu je 50 µl in die Kavitäten pipetiert. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Auch der sekundäre Antikörper (Sigma Anti-Human IgG mit Meerrettichperoxidase) musste zunächst 1:1000 mit Assay-

puffer verdünnt werden. Nach drei Waschschrritten wurde dieser zu je 50 µl in die Wells pipetiert. Eine Inkubation wurde für 30 Minuten bei 37 °C vorgenommen. In der Zwischenzeit wurde ein Substratpuffer vorbereitet, welcher nach drei Waschschrritten der Platte zu je 50 µl in die Wells pipetiert wurde. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur und einem sichtbaren Farbumschlag, wurde die Reaktion mit 25 µl Schwefelsäure (25 %) gestoppt. Die Platte wurde im Anschluss in einem Tecan-Reader (Wellenlänge von 492 nm, Referenzwellenlänge von 620 nm) ausgelesen. Eine Quantifizierung von p24 erfolgte anhand einer Standardkurve.

3.2.7 Magnetic Activated Cell sorting

Bei Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) handelt es sich um ein Zellseparationsverfahren mittels MicroBead gekoppelter Antikörper. Zur Durchführung wurde die zu untersuchende Zellsuspension zunächst bei 300g für 10 Minuten abzentrifugiert und dann in MACS-Puffer (40 µl pro 10^7 Zellen) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Mix aus verschiedenen Antikörpern (Miltenyi Biotec CD4⁺ T Cell Isolation Kit, 10 µl pro 10^7 Zellen) für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dieser Mix enthielt alle nötigen Antikörper (CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , und CD235a) für eine negative Selektion von CD4⁺ Zellen. Nach einer weiteren Zugabe von MACS-Puffer (30 µl pro 10^7 Zellen) wurde die Suspension mit einem MicroBead Cocktail (20 µl pro 10^7 Zellen) für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die MicroBeads binden spezifisch an die Antikörper. In der Zwischenzeit wurde eine LS Säule in einem starken Magnetfeld platziert und mit 3 ml MACS-Puffer kalibriert. Die markierte Zellsuspension wurde dann auf die LS Säule übertragen und die durchfließende Flüssigkeit in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die mit Antikörpern und MicroBeads markierten Zellen bleiben auf Grund des Magnetfeldes in der Säule zurück. Es kommt somit zu einer Anreicherung von CD4⁺ Zellen im Durchfluss. Die Säule wurde anschließend mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen, welcher ebenfalls aufgefangen wurde.

3.2.8 Fluorescence Activated Cell Sorting

Beim FACS handelt es sich um eine durchflusszytometrische Methode zur Charakterisierung von Zellen anhand verschiedener Eigenschaften wie Größe, Struktur und Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle. Dabei werden Fluoreszenz-markierte Zellen innerhalb eines laminaren Stroms einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Durch die Lichtstreuung und

das emittierte Licht der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, können die Zellen charakterisiert und zusätzlich mit Hilfe von elektrostatischer Ladung sortiert werden.

Zur Färbung wurden die Zellen zunächst bei 300g für 10 Minuten abzentrifugiert und in 4 ml FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde die benötigte Anzahl an 1,2 ml-Röhrchen vorbereitet. Neun Röhrchen wurden dafür zunächst mit einem Tropfen Ultracomp-Beads befüllt. Diese dienen als Kompensationskontrolle für einzelne Farbstoffe. Die Zellprobe wurde dann erneut abzentrifugiert, in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein leeres 1,2 ml-Röhrchen überführt. Für die Färbung wurden zwei Antikörpermischungen vorbereitet, die Tabelle 19 entnommen werden können. Nach der Zugabe der Mischungen oder einzelnen Antikörpern für die Beads, wurde für 45 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Es folgten drei Waschschrte, durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS und einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 300g.

Zur Verhinderung einer Kontamination des Gerätes und einer möglichen Infektion des Benutzers, wurden die Proben in 50 µl paraformaldehydhaltigem IC Fixierungspuffer für 15 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit fixiert. Danach folgte ein zusätzlicher Waschschrte. Im Anschluss wurden die Zellen in 50 µl PBS resuspendiert und bis zur Sortierung bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Die Sortierung erfolgte im FACS Aria, die Analyse erfolgte mit der Software FlowJo.

Tabelle 19: Antikörpermischungen und Anfärbung für eine Probe

Antikörper	Mischung 1 [µl]	Mischung 2 [µl]	Anfärbung [µl]
Anti-Human CD8a FITC	8		
Anti-Human CD14 FITC	40		
Anti-Human CD19 FITC	8		
Anti-Human CD25 Alexa Flour 488	16		
Anti-Human 69 FITC	16		
Anti-Human HLA-DR FITC	16		
Mischung 1		65	7 - für die Beads
Anti-Human CD4 BV605		25	5 - für die Beads
Anti-Human CD27 Alexa Flour 700		5	1 - für die Beads
Anti-Human CD45RA PE-Cyanine7		10	2 - für die Beads
Anti-Human CD45RO eFlour 450		10	2 - für die Beads
Anti-Human CD62L APC-eFlour780		5	2 - für die Beads
Anti-Human CD95 APC		10	2 - für die Beads
Anti-Human CCR7 PE-CF594		25	5 - für die Beads
Mischung 2			150 - für die Probe

4 Ergebnisse

4.1 Ablauf zur Quantifizierung proviraler HIV-1 DNA

Der in Abbildung 7 dargestellte Ablauf wurde vor Beginn dieser Arbeit am RKI etabliert und dient der parallelen Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 DNA in sortierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Teile dieses Ablaufs modifiziert, sowie eine HIV-1 spezifische nested-PCR etabliert. Vor der Analyse von fünf Vollblutproben von langzeitinfizierten HIV-1 Patienten, wurde der gesamte Ablauf, sowie einzelne Schritte, anhand verschiedener Proben getestet.

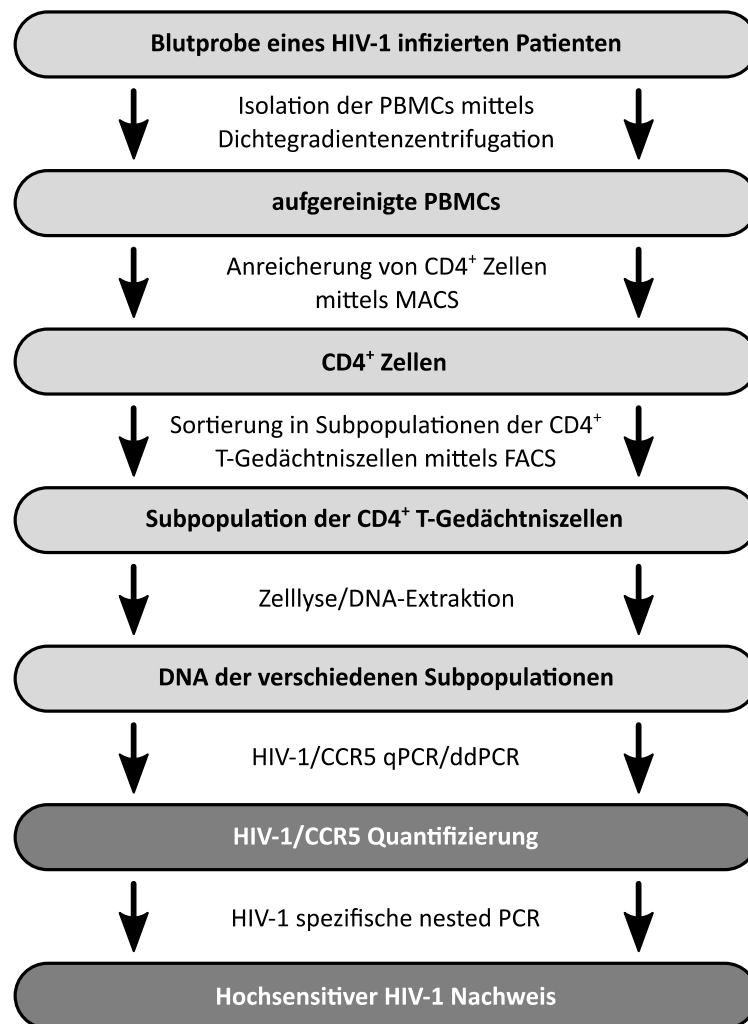


Abbildung 7: Workflow zur Quantifizierung von HIV-1 in Subpopulationen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen

Aus Vollblut werden zunächst die PBMCs isoliert, die CD4⁺ Zellen angereichert und dann in die verschiedenen Subpopulationen CD4⁺ T-Gedächtniszellen sortiert. Nach Aufbereitung der Zellproben durch Zellyse oder DNA-Extraktion wird eine PCR zur parallelen Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 durchgeführt, im Anschluss folgt gegebenenfalls eine nested-PCR.

4.2 Optimierung der Zellysebedingungen

4.2.1 CCR5 Standardreihe

Zum Vergleich verschiedener Lysebedingungen mittels qPCR wurde eine Standardreihe mit dem CCR5-Plasmid hergestellt. Die DNA wurde zunächst mit einem Nanodrop dreimal quantifiziert. Zur Berechnung der gewünschten Konzentration wurde der Mittelwert gebildet und die Teilchendichte anhand Gleichung (2) (siehe Abschnitt 3.1.6) berechnet.

Tabelle 20: Messung des CCR5 Plasmids mittels Nanodrop

Plasmid	Konzentration ng/ μ l	Stoffmenge Moleküle/ μ l
CCR5	1374	$3,33 \times 10^{11}$

Im Anschluss wurde die die DNA auf die gewünschten Konzentrationen von 2×10^0 bis 2×10^5 Kopien CCR5/ μ l verdünnt. Eine nachfolgende Analyse der Standardreihe mittels qPCR ermittelte eine Effizienz von 99,6 % und ein R^2 -Wert von 0,9994 (Abbildung 8). Die Effizienz einer Standardkurve wird mittels Gleichung (3) (siehe Abschnitt 3.1.6) berechnet.

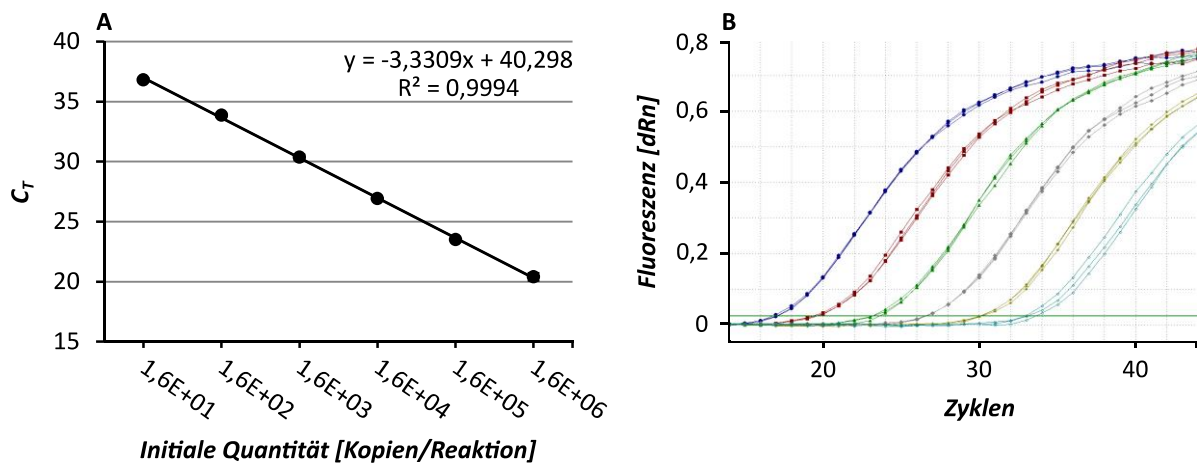


Abbildung 8: CCR5 Plasmidstandardreihe

A) Trendlinie der CCR5 Standardreihe. Der C_T (*Threshold Cycle*) stellt die Zyklenzahl dar, bei der das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Verdünnungsstufe einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

B) Amplifikationskurven der CCR5 Standardreihe. dRn stellt die normalisierte Fluoreszenzemission dar.

4.2.2 Verringerung des Lysevolumens

Um DNA aus fixierten Zellproben zu gewinnen, wurde die in Abschnitt 3.1.7 beschriebene direkte Lyse durchgeführt. Um die Menge der DNA und damit die mögliche Kopienzahl von HIV-1 innerhalb eines PCR Replikates zu erhöhen, sollte das Volumen des Lysepuffers verringert werden. Ursprünglich wurden die Zellpellets in 70 μl Lysepuffer resuspendiert, dieses Volumen wurde auf 40 μl verringert.

Es wurde getestet, ob die Verringerung des Volumens einen Einfluss auf die Lyseeffizienz hat. Dazu wurden Zellpellets von 10^4 C8166 Zellen in 70 μl oder 40 μl Lysepuffer lysiert und die Ergebnisse mittels einer CCR5 qPCR ermittelt.

In Abbildung 9 ist dargestellt, dass die Verringerung des Lysevolumens keinen signifikanten Einfluss auf die Lyseeffizienz hatte. Die Wiederfindungsrate von CCR5 lag im Mittel für 70 μl bei 53,5% und für 40 μl bei 50,9%. Diese errechnet sich aus dem prozentualen Anteil der gemessenen CCR5 Kopien an der theoretisch eingesetzten Kopienzahl, die sich durch die Anzahl der eingesetzten Zellen ergibt.

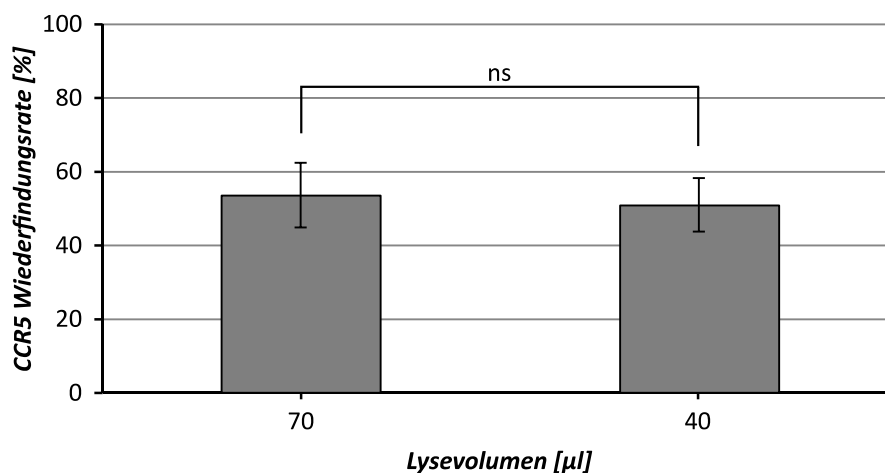


Abbildung 9: Einfluss des Lysevolumens auf CCR5 Wiederfindungsrate

Vergleich der CCR5 Wiederfindungsrate von 10^4 C8166 Zellen lysiert in 70 μl oder 40 μl Lysepuffer. Die Wiederfindungsrate wurde aus den Mittelwerten der qPCR Replikate berechnet. Durchgeführt wurde ein Student's t-Test (ns (nicht signifikant) = $P > 0,05$).

4.2.3 Anpassung der Zellzahl

Nach der Sortierung der CD4⁺ T-Gedächtniszellen, kann die Anzahl an Zellen pro Subtyp stark schwanken. Um einen Verlust von Zellen beziehungsweise DNA bei einer geringen Zellzahl zu vermeiden und gleiche Bedingungen in jeder Probe zu erzeugen, sollten diese mit weiteren Zellen auf die gleiche Anzahl aufgefüllt werden. Dafür eignen sich ausschließlich solche Zellen, die weder das Fluoreszenzsignal in der qPCR noch die Lyseeffizienz beeinträchtigen.

Zunächst wurden die caninen Cf2Th, felines CrFK und murinen EL-4 Zellen in Kultur genommen. Um herauszufinden, ob das Gen für CCR5 dieser Spezies in der qPCR detektierbar ist, wurden von jeder Kultur Zellpellets hergestellt, lysiert und mittels CCR5 qPCR analysiert. Dabei wurde Zellysate von jeweils 5×10^5 Cf2Th, CrFK und EL-4 Zellen untersucht. Ein Zellpellet mit 10^4 C8166 Zellen diente der Positivkontrolle. Aus Teil A der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass ausschließlich für die C8166 Kontrolle ein Fluoreszenzsignal detektierbar war. Somit eigneten sich jede der untersuchten Zelllinien. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden ausschließlich CrFK Zellen genutzt, die zusätzlich auf unspezifische Amplifikation mit allen genutzten Primern untersucht wurden. Dazu wurde Zellysate von 5×10^5 CrFK Zellen mittels konventioneller PCR untersucht, 10^4 Kopien des pNL4-3 oder CCR5 Plasmids diente der Kontrolle (Abbildung 10, Teil B). Es zeigte sich bei den CCR5 Primern eine leichte unspezifische Amplifikation, die jedoch nicht zu einem Fluoreszenzsignal in der qPCR führte.

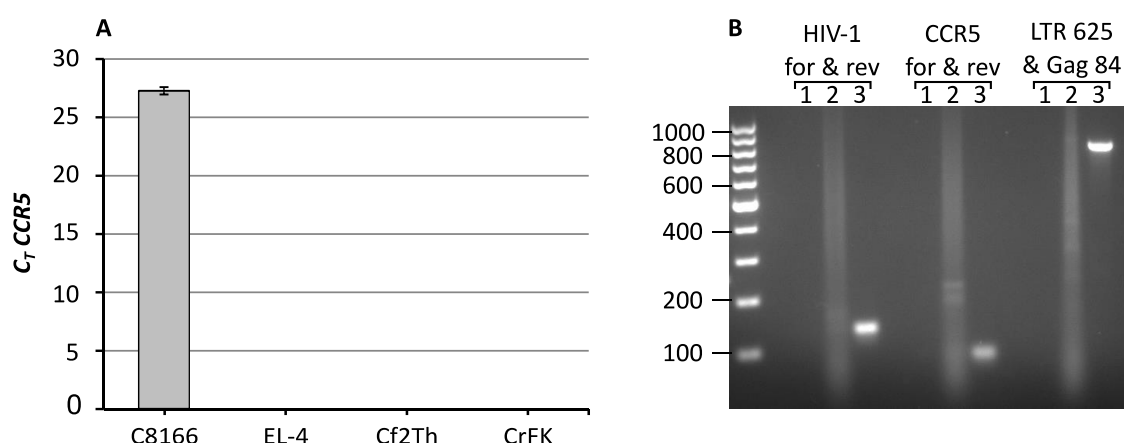


Abbildung 10: CCR5 qPCR mit verschiedenen Zelllysaten, konventionelle PCR mit CrFK Zellen

A) C_T -Werte der CCR5 qPCR mit Zellysate verschiedener Zelllinien

B) Konventionelle PCR mit CrFK Zellysate. 1 – Wasserkontrolle, 2 – CrFK Zellysate, 3 – Positivkontrolle. Getestet wurden die Malnati HIV-1 und CCR5 Primer, sowie LTR 625 forward und Gag 84 reverse.

Um sicher zu stellen, dass die CrFK Zellen keinen Einfluss auf die Lyseeffizienz oder das HIV-1 beziehungsweise CCR5 Signal der HIV-1/CCR5 qPCR haben, wurde ein Vergleich verschiedener Zellpellets vorgenommen. Dazu wurden Pellets von 10^4 ACH-2 Zellen hergestellt, diese wurden entweder mit CrFK Zellen auf eine Gesamtzellzahl von 5×10^5 Zellen aufgefüllt oder ohne CrFK lysiert.

Aus Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass die CrFK Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Lyseeffizienz oder das HIV-1/CCR5 Fluoreszenzsignal hatten. Es zeigt sich bei beiden Proben für CCR5 ein C_T -Wert von circa 29 und für HIV-1 ein C_T -Wert von circa 31.

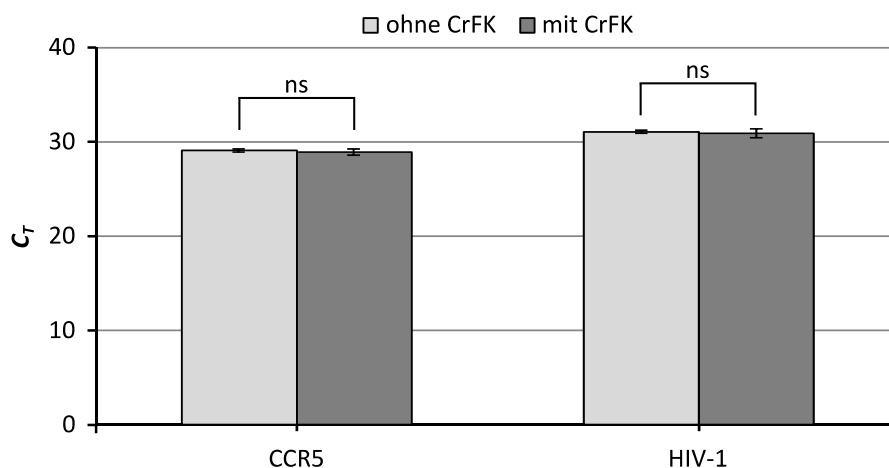


Abbildung 11: Einfluss von CrFK Zellen auf die Lyseeffizienz und das HIV-1/CCR5 Signal der qPCR

HIV-1/CCR5 qPCR C_T -Werte für ACH-2 Zelllysate ohne CrFK Zellen (hellgrau) und mit CrFK Zellen (dunkelgrau).

Durchgeführt wurde ein Student's t-Test (ns (nicht signifikant) – $P > 0,05$).

4.2.4 Test der neuen Lysebedingungen mit Patientenproben

Zum Testen der veränderten Lysebedingungen an Patientenproben, wurden Aliquots von sortierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen des „Düsseldorf Patienten“ (DüPa) bereitgestellt [79]. Die Proben hatten eine Größe von 10⁴ Zellen pro Subtyp und wurden mit CrFK Zellen auf eine Gesamtzellzahl von 5x10⁵ Zellen aufgefüllt. Die Lyse wurde mit dem verringerten Volumen von 40 µl durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der HIV-1/CCR5 qPCR im Vergleich mit Ergebnissen einer vorherigen Analyse dieser Proben mit den alten Lysebedingungen. Das Experiment mit den neuen Lysebedingungen wies im Vergleich eine höhere CCR5 Wiederfindungsrate auf. Beide qPCRs wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, zur Quantifizierung wurden Aliquots derselben HIV-1/CCR5 Standardreihe verwendet. HIV-1 konnte nicht detektiert werden.

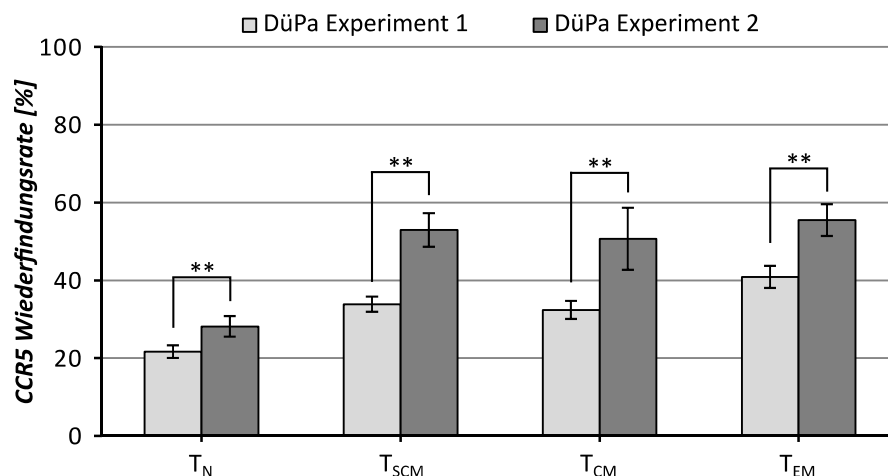


Abbildung 12: Analyse der „DüPa“ Proben mit unterschiedlichen Lysebedingungen

Ergebnisse qPCR mit neuen Lysebedingungen (40 µl Lysepuffer, CrFK Zellen, dunkelgraue Balken) und alten Lysebedingungen (70 µl Lysepuffer, keine CrFK-Zellen, hellgraue Balken) Untersucht wurden die T_N, T_{SCM}, T_{CM} und T_{EM} Subpopulationen der CD4⁺ T-Gedächtniszellen. Students t-Test (**- P<0,005)

4.3 HIV-1/CCR5 qPCR

4.3.1 HIV-1/CCR5 Standardreihe

Um eine möglichst verlässliche Standardreihe für eine qPCR herzustellen, wurde zur Quantifizierung der Plasmid DNA eine fluorometrische Messung mittels Qubit durchgeführt.

Tabelle 21: Messung der Plasmid DNA mittels Qubit

Plasmid	Konzentration <i>ng/μl</i>	Teilchendichte <i>Moleküle/μl</i>
CCR5	6,27	$1,52 \times 10^9$
pNL4-3	432	$2,84 \times 10^{10}$

Die DNA wurde im Anschluss verdünnt und eine HIV-1/CCR5 Standardreihe hergestellt. Diese deckte einen Bereich von 5×10^{-2} bis 5×10^5 Kopien/μl ab. Der Standard erreichte für CCR5 eine Effizienz von 103,2 %, da die Steigung einen Wert von 3,3 überschritt, und für HIV-1 eine Effizienz von 98,9 %. Die R^2 Werte betragen 0,9925 und 0,9985 (Abbildung 13).

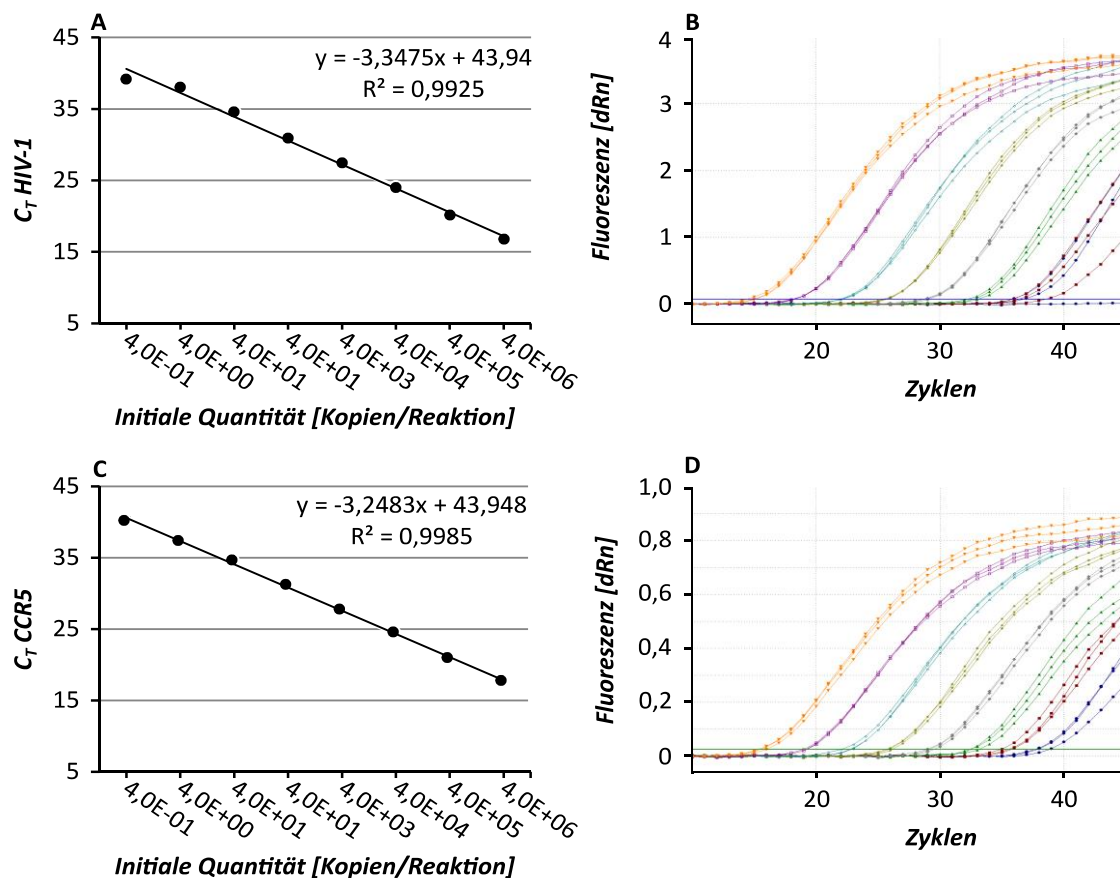


Abbildung 13: HIV-1/CCR5 Plasmidstandardreihe

A) und C) Trendlinie der HIV-1/CCR5 Standardreihe. Der C_T (*Threshold Cycle*) stellt die Zyklenzahl dar, bei der das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Verdünnungsstufe einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

B) Amplifikationskurven der HIV-1/CCR5 Standardreihe. dRn stellt die normalisierte Fluoreszenzemission dar.

4.3.2 Sensitivität der HIV-1/CCR5 qPCR

Aufgrund einer niedrigen Frequenz von HIV-1 Proviren in Immunzellen des peripheren Blutes ist es wichtig, eine hochsensitive Methode zur Quantifizierung zu nutzen.

Um die Verlässlichkeit einer Detektion in der niedrigsten Verdünnungsstufe der Standardreihe zu überprüfen und herauszufinden, ob die qPCR eine einzelne Kopie HIV-1 in einem PCR-Replikat detektieren kann, wurde die niedrigste Stufe von 5×10^{-2} Kopien HIV-1/CCR5 pro μl in insgesamt 26 Replikaten mittels HIV-1/CCR5 qPCR getestet. Es wurden 8 μl dieser Stufe pro Replikat eingesetzt. Dies entspricht einem Mittelwert von 0,4 Kopien HIV-1 pro Replikat. Das Ergebnis dieser qPCR entspricht für HIV-1 den Wahrscheinlichkeiten der Poisson-Verteilung mit $\lambda = 0,48$ (siehe Gleichung (1), Abschnitt 3.1.4), für CCR5 ergab sich eine minimale Abweichung mit $\lambda = 0,55$ (Abbildung 14).

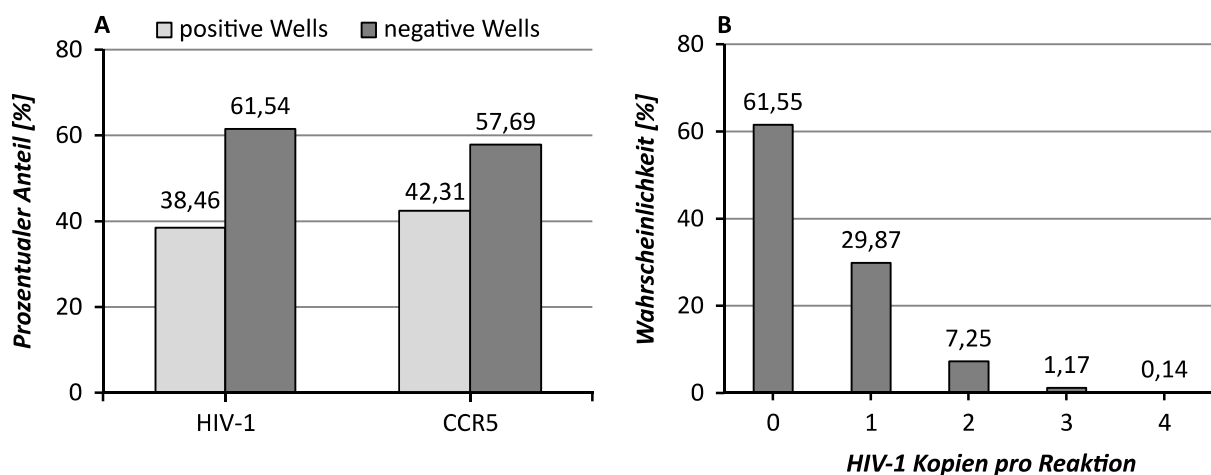


Abbildung 14: qPCR der untersten Stufe der Standardreihe und passende Poisson-Verteilung

A) Prozentualer Anteil an positiven (hellgrau) und negativen Wells (dunkelgrau) der qPCR mit einem theoretischen Mittelwert von 0,4 Kopien HIV-1 pro Replikat.

B) Poisson-Verteilung mit $\lambda = 0,48$. Gezeigt wird die theoretische Wahrscheinlichkeit für 0 bis 4 HIV-1 Kopien pro Replikat, bei einem Mittelwert von 0,48 Kopien HIV-1.

Bei der Untersuchung von Patientenproben müssen niedrige Kopienzahlen HIV-1 in einem hohen genomischen Hintergrund detektiert werden. Um die qPCR diesbezüglich zu testen, wurden niedrige Verdünnungen von ACH-2 DNA in einem genomischen Hintergrund von je 660 ng C8166 DNA hergestellt. Für eine möglichst genaue Verdünnungsreihe wurde die HIV-1 DNA zuvor fluorometrisch mit einem Qubit quantifiziert. Im Anschluss wurde die

DNA so verdünnt, dass sie bei einem Einsatz von 8 μ l einem Mittelwert von 0,5 bis 20 Kopien HIV-1 in 660 ng C8166 DNA pro Reaktion entspricht.

Tabelle 22: Messung von genomischer DNA mittels Qubit

Ursprung gDNA	Konzentration μ g/ml
ACH-2	66,6

In jeder Verdünnungsstufe konnte ein HIV-1 Signal ermittelt werden (Abbildung 15). Die Messungen von CCR5 blieben konstant, der C_T -Wert lag im Schnitt bei circa 22,5.

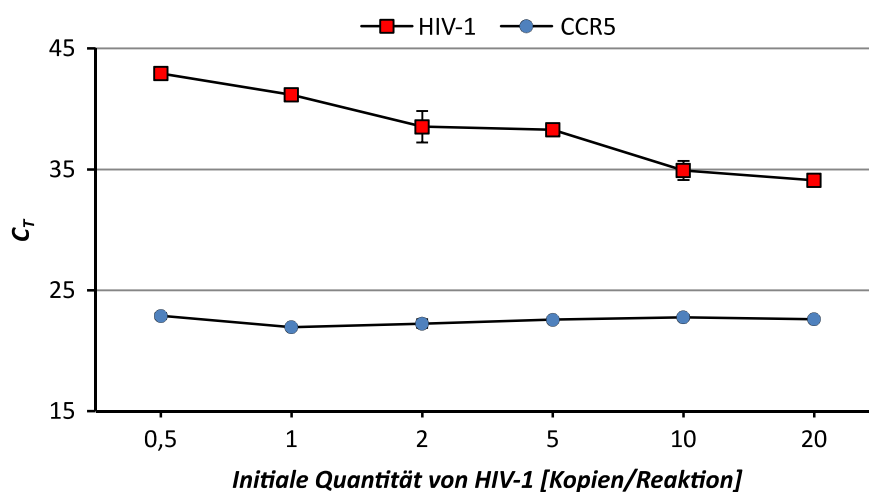


Abbildung 15: Sensitivität HIV-1/CCR5 qPCR mit ACH-2 in C8166 DNA

Mittelwerte der C_T -Werte von HIV-1 und CCR5 der qPCR Replikate von einzelnen Kopien ACH-2 DNA in 660 ng C8166 DNA.

Da es sich bei den zu messenden Patientenproben um Zelllysate von fixierten PBMCs handelt, wurde die Sensitivität der HIV-1/CCR5 qPCR auch mit Lysat getestet. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 10^4 bis 10^0 fixierten ACH-2 Zellen in 10^5 fixierten C8166 Zellen angelegt. Die Proben wurden zusätzlich mit CrFK Zellen auf eine Anzahl an 5×10^5 Zellen aufgefüllt. Die Abbildung 16 zeigt, dass auch hier einzelne Kopien HIV-1 detektiert werden konnten. Für 2×10^0 bis 2×10^3 HIV-1 Kopien pro Reaktion konnte ein Signal detektiert werden. Bei 2 theoretischen Kopien HIV-1 pro Reaktion wurden nur zwei von drei Replikaten positiv für HIV-1. Der C_T -Wert von CCR5 schwankte bei einem Mittelwert von 24.

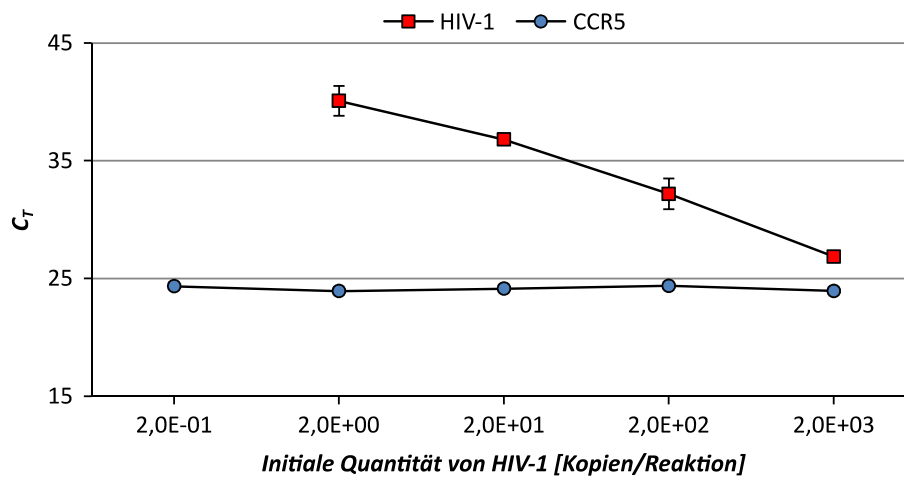


Abbildung 16: Sensitivität HIV-1/CCR5 qPCR mit einer Verdünnungsreihe aus ACH-2 Zellen

Mittelwerte der C_T -Werte von HIV-1 und CCR5 der qPCR Replikate von ACH-2 Zellen in einem konstanten Hintergrund von C8166 und CrFK Zellen.

4.4 Etablierung einer nested-PCR

Da die qPCR bei sehr niedrigen Kopienzahlen von HIV-1 hohe C_T -Werte annimmt und dadurch falsch-positive Messungen nicht ausgeschlossen werden können, wurde zur Erhöhung der Spezifität eine HIV-1 spezifische nested-PCR etabliert. Diese vereint eine konventionelle PCR und die HIV-1/CCR5 qPCR und dient der Verifizierung der mittels qPCR gewonnenen Daten.

4.4.1 Optimierung der äußeren PCR

Zur Ermittlung optimaler Konditionen der out-PCR, wurde zunächst der Einfluss verschiedener Primer- oder $MgCl^{2+}$ -Konzentrationen auf die nested-PCR untersucht. Dieser wurde im Hinblick auf die Amplifikation innerhalb der äußeren und inneren PCR analysiert. Als Template dienten circa 40 Kopien HIV-1 (pNL4-3) in 380 ng 293T DNA.

Aus Abbildung 17 kann entnommen werden, dass die verschiedenen Konzentrationen der Primer und des $MgCl^{2+}$ keinen Einfluss auf die CCR5 Amplifikation haben, der C_T -Wert lag im Mittel bei circa 27. Für HIV-1 ergab sich bei einer Primerkonzentration von 100 nM ein C_T -Wert von 28,94, welcher mit steigender Konzentration bis auf einen Wert von 20,15 sank. Eine effiziente Amplifikation ergab sich ab einer Primerkonzentration von 300 nM.

Hohe $MgCl^{2+}$ -Konzentrationen von 1,5 bis 2,5 mM hatten keinen Einfluss auf den C_T -Wert von HIV-1, es zeigte sich eine effiziente Amplifikation. Ab einer Konzentration von 1 mM, verschlechterte sich das Signal um 2 Zyklen. Für den weiteren Verlauf wurde eine Primerkonzentration von 400 nM, sowie eine $MgCl^{2+}$ Konzentration von 2 mM gewählt.

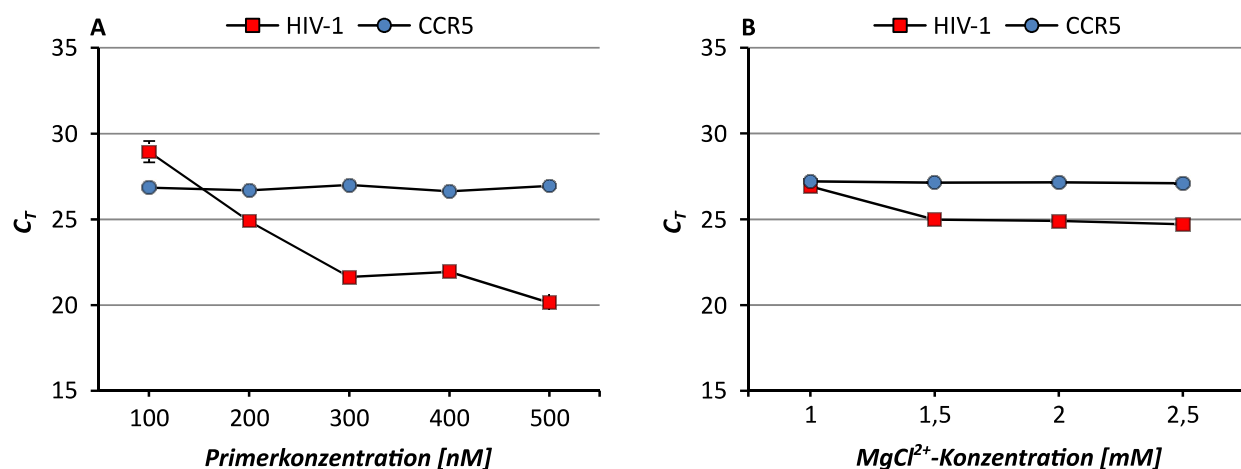


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Primer- oder $MgCl^{2+}$ -Konzentrationen auf die nested-PCR

A) C_T -Werte für HIV-1 und CCR5 bei verschiedenen Primerkonzentrationen.

B) C_T -Werte für HIV-1 und CCR5 bei verschiedenen $MgCl^{2+}$ -Konzentrationen

Im Anschluss wurde die optimale Annealing-Temperatur der out-PCR ermittelt. Dazu wurde zunächst die Schmelztemperatur der Primer mittels AmplifX berechnet, diese betrug 57 °C für den Gag_84 Reverse Primer und 53 °C für den LTR_625 Forward Primer. Dann wurde eine PCR mit Temperaturgradienten von 54 °C bis 58 °C angesetzt und mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Es wurden pro Ansatz 10⁴ Kopien HIV-1 (pNL4-3 Plasmid) mit oder ohne 380 ng 293T DNA eingesetzt.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass bei einer Temperatur unter 57 °C eine unspezifische Amplifikation stattfand. Bei der genomischen DNA ist eine deutliche Gelbande von circa 800 bp zu erkennen, die ab einer Temperatur von 57 °C verschwindet. Das spezifische Produkt der out-PCR hat eine Größe von 752 bp, welches deutlich beim Einsatz von HIV-1 erkennbar ist. Ab 58 °C werden alle Gelbanden schwächer. Für den weiteren Verlauf der Arbeit, wurde eine Annealing-Temperatur von 57 °C verwendet.

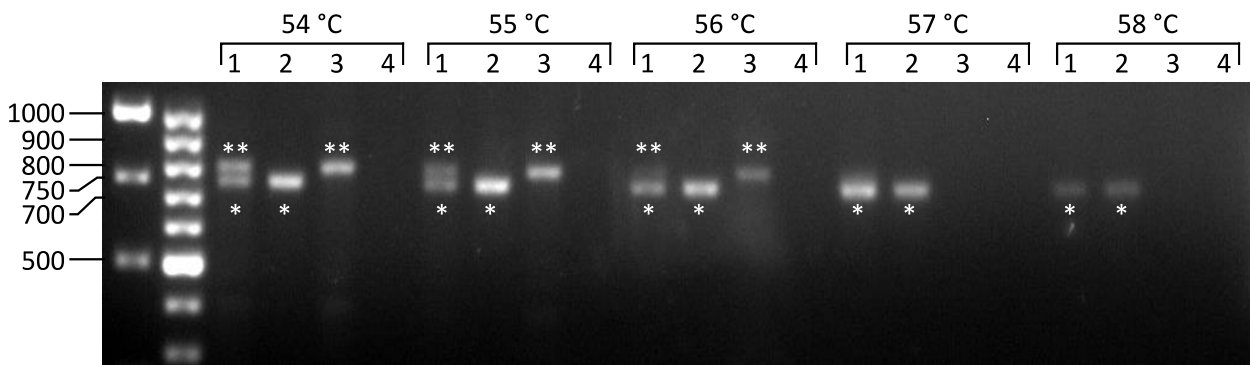


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese der Gradienten-PCR

Am linken Rand befindet sich der DNA-Standard. Von rechts nach links, Gradient von 54 °C bis 58 °C, eingeteilt in 1 – Plasmid-DNA und genomische DNA, 2 – Plasmid-DNA, 3 – genomische DNA, 4 – Wasserkontrolle. * - spezifisches Produkt, ** - unspezifisches Produkt.

4.4.2 Sensitivität der nested-PCR

Um die Funktion und Sensitivität der nested-PCR zu testen, wurde die HIV-1/CCR5 Plasmidstandardreihe als Template genutzt. Dazu wurden je 10 µl der Stufen 5x10⁻² Kopien/µl bis 5x10³ Kopien/µl als Probe eingesetzt. Von der out-PCR wurden 2,5 µl des Amplikons in die in-PCR übertragen. Die Abbildung 19 zeigt eine deutliche Verschiebung des C_T-Wertes von HIV-1 im Vergleich zur normalen HIV-1/CCR5 qPCR, diese beträgt bei jeder Stufe zwischen 12 und 13 Zyklen. Die Plasmid-DNA konnte bis zu einer Stufe von 5x10⁻¹ Kopien/µl (5 Kopien/Reaktion) detektiert werden.

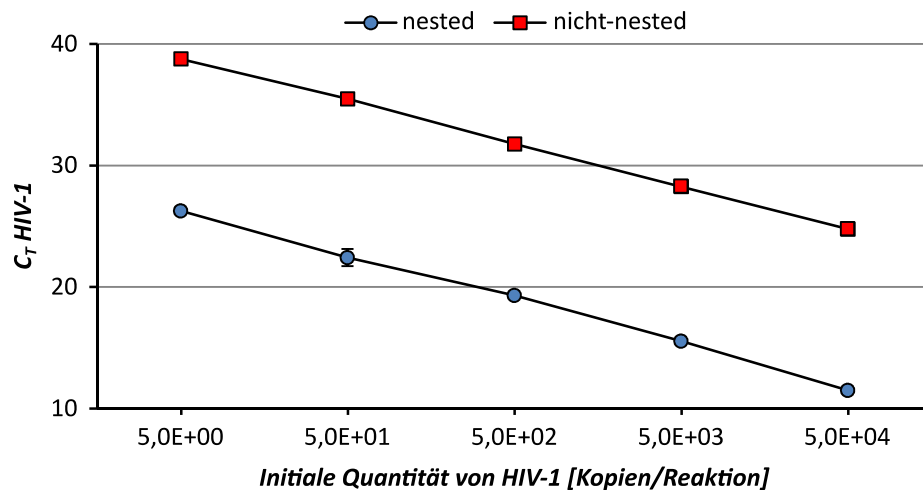


Abbildung 19: Vergleich qPCR und nested-PCR mit der HIV-1/CCR5 Standardreihe

Mittelwerte der C_T -Werte für HIV-1 der einzelnen Stufen der Standardreihe für die qPCR (rot) und die nested-PCR (blau) im Vergleich.

Zur weiteren Analyse der Sensitivität wurden die in Abschnitt 4.3.2 erwähnten niedrigen Verdünnungen von extrahierter ACH-2 DNA mit einem genomischen Hintergrund von 660 ng C8166 DNA in der nested-PCR getestet. Abbildung 20 zeigt eine Detektion von HIV-1 bis zu einer Kopienzahl von 0,5 Kopien/Reaktion. Für CCR5 zeigt sich ein Anstieg des C_T -Wertes. Je niedriger der C_T -Wert von HIV-1 desto höher der C_T -Wert von CCR5. Aus diesem Grund ist keine verlässliche Quantifizierung von CCR5 mit der nested-PCR möglich.

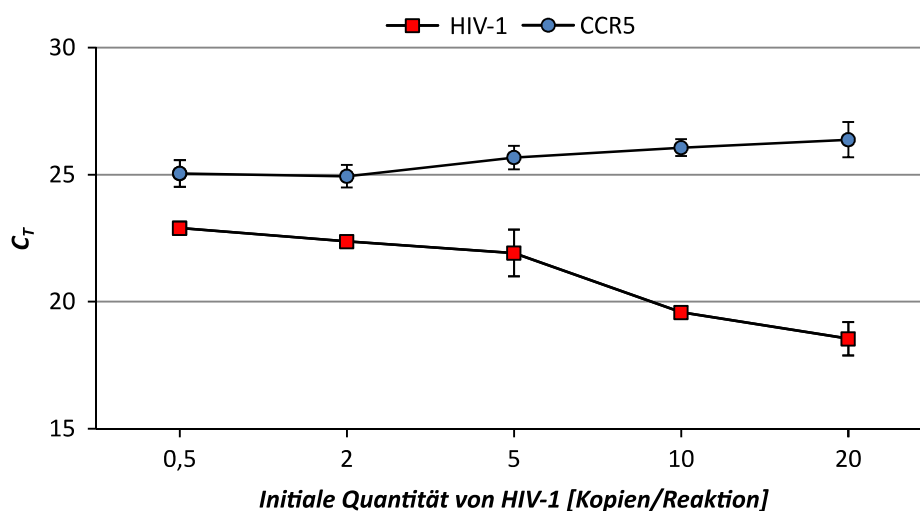


Abbildung 20: Sensitivität der nested-PCR mit ACH-2 DNA in C8166 DNA

Darstellung des Mittelwertes der qPCR Replikate und deren Standardabweichung. C_T -Werte von HIV-1 (rot) und CCR5 (blau) bei der Analyse von niedrigen Verdünnungen ACH-2 DNA in einem hohen genomischen Hintergrund von 660 ng C8166 DNA. Für 0,5 Kopien/Reaktion wurde nur ein Replikat positiv getestet, für 1 Kopie/Reaktion wurde kein Replikat positiv getestet.

Auch die nested-PCR wurde mit der in Abschnitt 4.3.2 genannten Verdünnungsreihe mit ACH-2 Zellen getestet. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass eine Detektion bis 2 Kopien HIV-1 pro Reaktion möglich war. Der C_T -Wert ist im Vergleich zur qPCR um mindestens 12 Zyklen verschoben. Das HIV-1 Signal hat einen deutlichen Einfluss auf das CCR5 Signal, je niedriger der C_T -Wert für HIV-1, umso höher der C_T -Wert für CCR5.

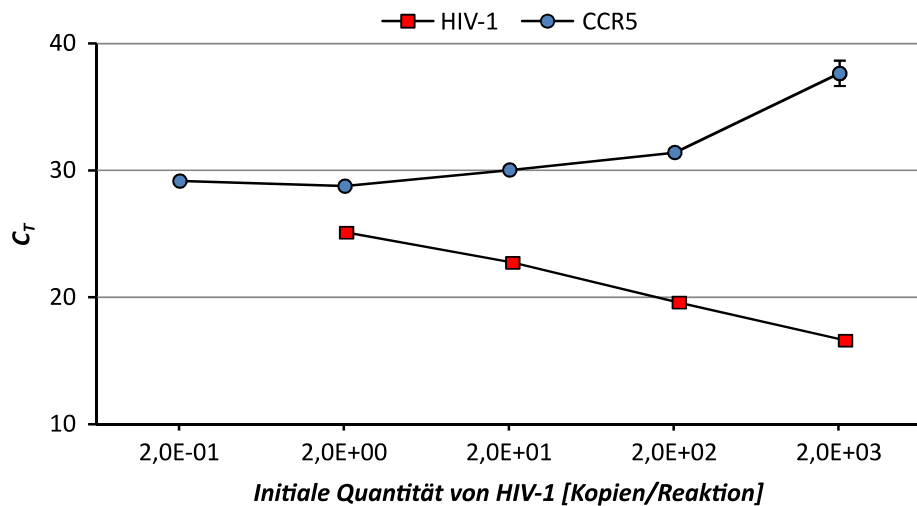


Abbildung 21: nested-PCR mit Verdünnungsreihe aus ACH-2 Zellen

Mittelwerte der C_T -Werte von HIV-1 und CCR5 der nested-PCR Replikate von ACH-2 Zellen in einem konstanten Hintergrund von C8166 und CrFK Zellen.

4.5 *In vitro* Infektion von PBMCs

Um einen Test des Ablaufs zur Quantifizierung von HIV-1 in sortierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen durchzuführen, wurde eine *in vitro* Infektion von PBMCs mit HIV-1_{Bal} vorgenommen. Die Infektion erfolgte nach dem in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Protokoll. Um eine hohe Infektionsrate zu vermeiden, wurde eine Inkubationszeit von drei Tagen ausgewählt. Währenddessen wurden täglich Proben des Mediums für einen p24 ELISA entnommen. Die infizierten Zellen wurden nach der Ernte fixiert.

Vor der Sortierung der Zellen sollte mittels HIV-1/CCR5 qPCR und ELISA festgestellt werden, ob die Infektion erfolgreich war. In Abbildung 22 wird ein Anstieg des p24 Antigens ab dem zweiten Tag der Inkubation deutlich. Mit der HIV-1/CCR5 qPCR konnte ein Mittelwert von 170 HIV-1 Kopien pro 10³ Zellen nachgewiesen werden, nicht infizierte Zellen dienten der Kontrolle.

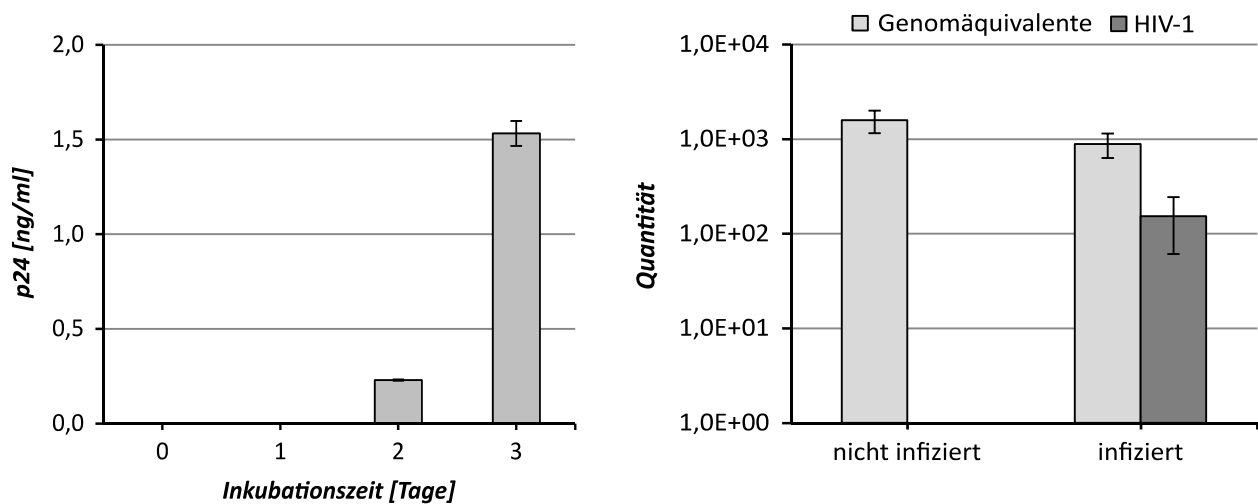


Abbildung 22: *In vitro* Infektion von PBMCs mit HIV-1_{Bal}

A) p24 ELISA, die Menge des gemessenen p24 Antigens an den verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation. Darstellung des Mittelwertes von Duplikaten.

B) HIV-1/CCR5 qPCR mit *in vitro* infizierten PBMCs. Die gemessenen Kopien von HIV-1 (dunkelgrau) und CCR5 (hellgrau) der infizierten PBMCs und der Kontrolle von nicht-infizierten PBMCs. Darstellung des Mittelwertes der PCR-Replikate und deren Standardabweichung.

4.5.1 Sortierung der *in vitro* infizierten PBMCs mittels FACS

Die infizierten und nicht-infizierten PBMCs wurden für den weiteren Verlauf vereint und im Anschluss mit den in Tabelle 19 aufgeführten Antikörpern markiert. Die Sortierung wurde im FACS Aria II durchgeführt. Mit dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden zunächst die Lymphozyten anhand von Größe und Granularität von anderen Zellen getrennt. Solche Zellen, die nicht den CD4 Rezeptor exprimieren, wurden aussortiert. Zur Identifikation der Subpopulationen von CD4⁺ Gedächtniszellen wurde eine spezielle Gating-Strategie angewandt, welche auf der Expression verschiedener Oberflächenantigene beruht. Die Antikörperkombinationen zur Sortierung der verschiedenen Subtypen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen sind in Tabelle 19 dargestellt. Nach der Sortierung erfolgte eine Analyse mittels FlowJo Software.

Für die *in vitro* infizierten PBMCs wurden die Subpopulationen T_N und T_{TM} während der Sortierung vereint (Tabelle 23). Eine Strategie, um Verlust bei einer niedrigen Anzahl von Zellen zu vermeiden, da diese die kleinsten Populationen aufwiesen. Die größte Subpopulation repräsentierten die T_{CM}.

Tabelle 23: Zellzahlen der verschiedenen Subpopulationen nach Sortierung mittels FACS

T _N + T _{TM}	T _{SCM}	T _{CM}	T _{EM}
1204	156281	892885	28358

4.5.2 HIV-1/CCR5 qPCR von *in vitro* infizierten PBMCs

Nach der Sortierung wurde mit Hilfe der HIV-1/CCR5 qPCR die Anzahl an HIV-1 Proviren pro Subpopulation quantifiziert. Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Wiederfindungsrate betrug für die T_{EM}, T_N und T_{TM} circa 50 %, während für die T_{SCM} die höchste Rate von circa 80 % ausgemacht werden konnte. Von den T_{CM} konnten nur 38 % der initial eingesetzten Genomäquivalente gemessen werden. In allen untersuchten Subpopulationen konnte HIV-1 DNA detektiert werden.

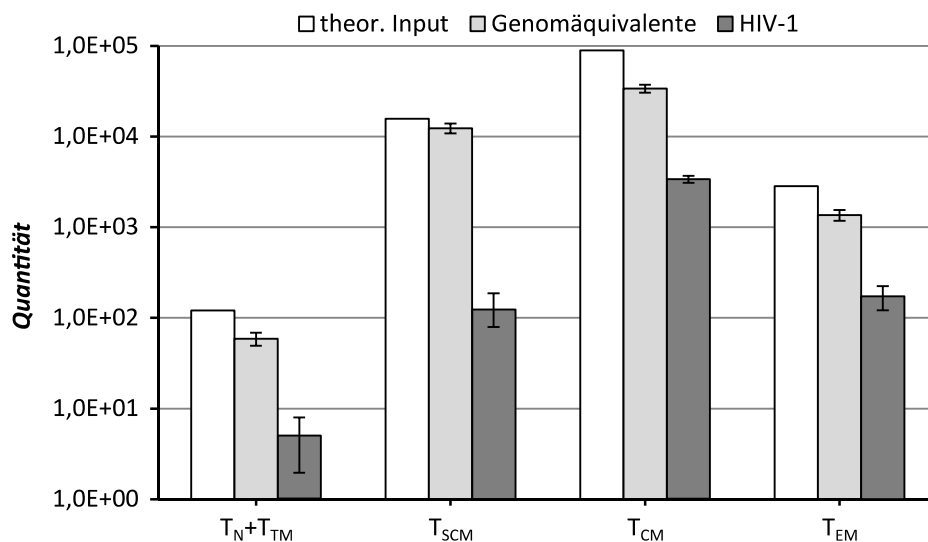


Abbildung 23: Quantifizierung von CCR5 und HIV-1 in *in vitro* infizierten PBMCs

Darstellung der gemessenen Genomäquivalente (hellgrau) und der HIV-1 Kopien (dunkelgrau) pro Subpopulation der $CD4^+$ T-Gedächtniszellen. Angabe des Mittelwerts der qPCR Replikate, sowie deren Standardabweichung. Der theoretische Input pro Replikat (weiß) ist ebenfalls dargestellt.

Der prozentuale Anteil jeder Subpopulation an der gemessenen Gesamtzellzahl, ist in Teil A der Abbildung 24 dargestellt. Den geringsten Anteil mit 0,12% machten die T_N/T_{TM} aus. Die T_{CM} stellten mit 71,04% die größte Subpopulation. Die Frequenz an HIV-1 Kopien schwankte zwischen den einzelnen Subpopulationen sehr stark. In Teil B der Abbildung 24 ist die Anzahl an gemessenen HIV-1 Kopien pro 10^3 Zellen je Subpopulation dargestellt. Die höchste Frequenz an HIV-1 DNA konnte in den T_{EM} ausgemacht werden. Hier konnte ein Mittelwert von 126,56 HIV-1 Kopien pro 10^3 Zellen ermittelt werden. Die niedrigste Frequenz konnte mit 9,94 HIV-1 Kopien bei den T_{SCM} gemessen werden.

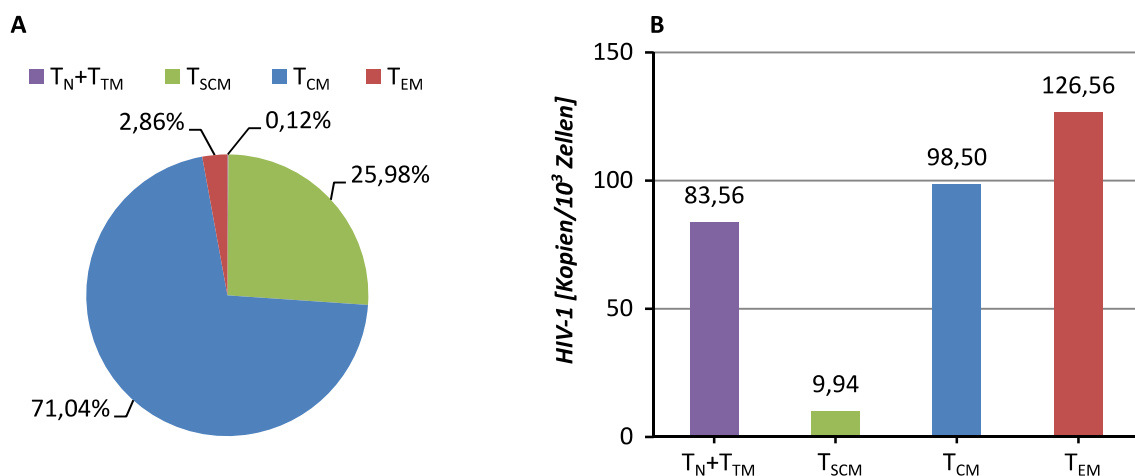


Abbildung 24: Anteil der Subpopulationen an der Gesamtzellzahl und Frequenz der HIV-1 Kopien

A) Prozentualer Anteil der Subpopulationen an der Gesamtzellzahl in Prozent.

B) HIV-1 Kopien pro 10^3 Zellen je Subpopulation. Darstellung des Mittelwerts der qPCR Replikate.

4.6 Messung von Patientenproben

4.6.1 HIV-1 Serokonverterstudie

Im Rahmen der am RKI durchgeführten HIV-1 Serokonverterstudie konnten DNA-Proben von zwei HIV-1 Patienten zur Verfügung gestellt werden. Es handelte sich dabei um extrahierte DNA aus PBMCs. So konnte die Tauglichkeit dieser beiden Assays mit Proben von HIV-1-infizierten Patienten getestet werden, welche zu dem Zeitpunkt der Entnahme eine Viruslast nachzuweisen hatten. Die Proben wurden so gewählt, dass es sich dabei um einen Patienten mit einer niedrigen Viruslast und einen Patienten mit einer sehr hohen Viruslast handelte (Tabelle 24).

Tabelle 24: DNA-Proben der Serokonverterstudie des RKI

Patienten ID	RNA-Viruslast <i>Kopien/ml</i>	DNA-Konzentration <i>ng/μl</i>
16-1972	$2,9 \times 10^3$	357
16-1436	1×10^7	119

Beide Proben wurden sowohl mit der CCR5/HIV-1 qPCR als auch mit der HIV-1 spezifischen nested-PCR getestet. Bei Patient 16-1436 konnte mit beiden Assays HIV-1 DNA nachgewiesen werden, während bei Patient 16-1972 nur die nested-PCR ein positives HIV-1 Signal zeigte (Abbildung 25). Für Patient 16-1436 konnten im Schnitt 11 HIV-1 Kopien in 1×10^5 Zellen quantifiziert werden.

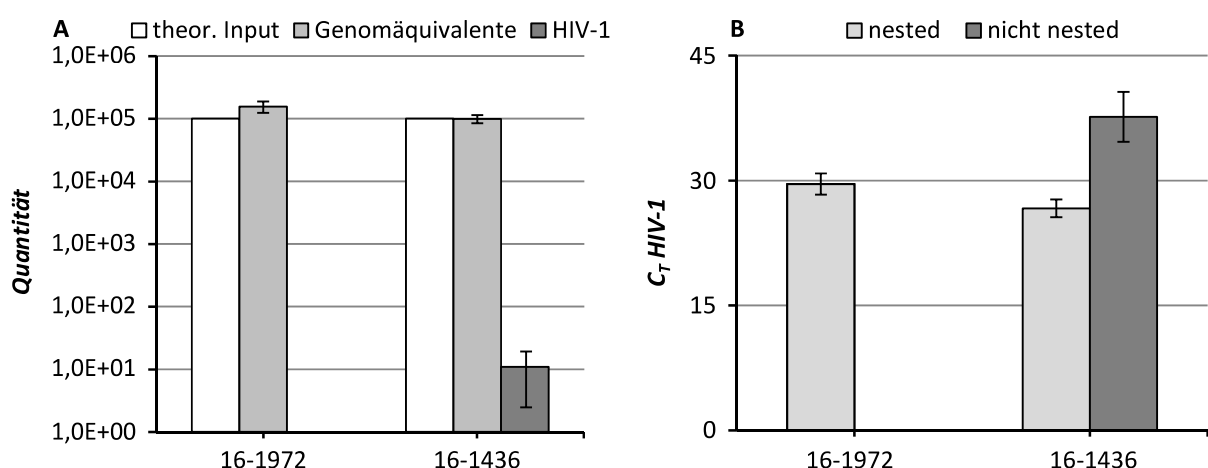


Abbildung 25: Analyse Serokonverter Proben

A) HIV-1/CCR5 qPCR der Serokonverter Proben. Darstellung des theoretischen Input an Zellen (weiß), Genomäquivalente (hellgrau) und HIV-1 Kopien (dunkelgrau).

B) Ergebnis der nested-PCR. C_T -Wert von HIV-1 der nested-PCR (hellgrau) im Vergleich mit der qPCR (dunkelgrau).

4.6.2 Langzeitinfizierte HIV-1 Patienten

Zur Messung der Proviruslast in CD4⁺ Gedächtniszellen, wurden fünf anonyme Blutproben von langzeitinfizierten HIV-1 Patienten aus der Praxis Dr. Steinbeck-Klose zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Vollblut mit einem Volumen zwischen 35 ml und 90 ml.

Die Proben wurden nach dem in Abschnitt 4.1 skizzierten Ablauf zur Quantifizierung von HIV-1 Proviren in CD4⁺ T-Gedächtniszellen behandelt. Abbildung 26 zeigt den Ablauf der Sortierung mittels FACS am Beispiel des Patienten 2.

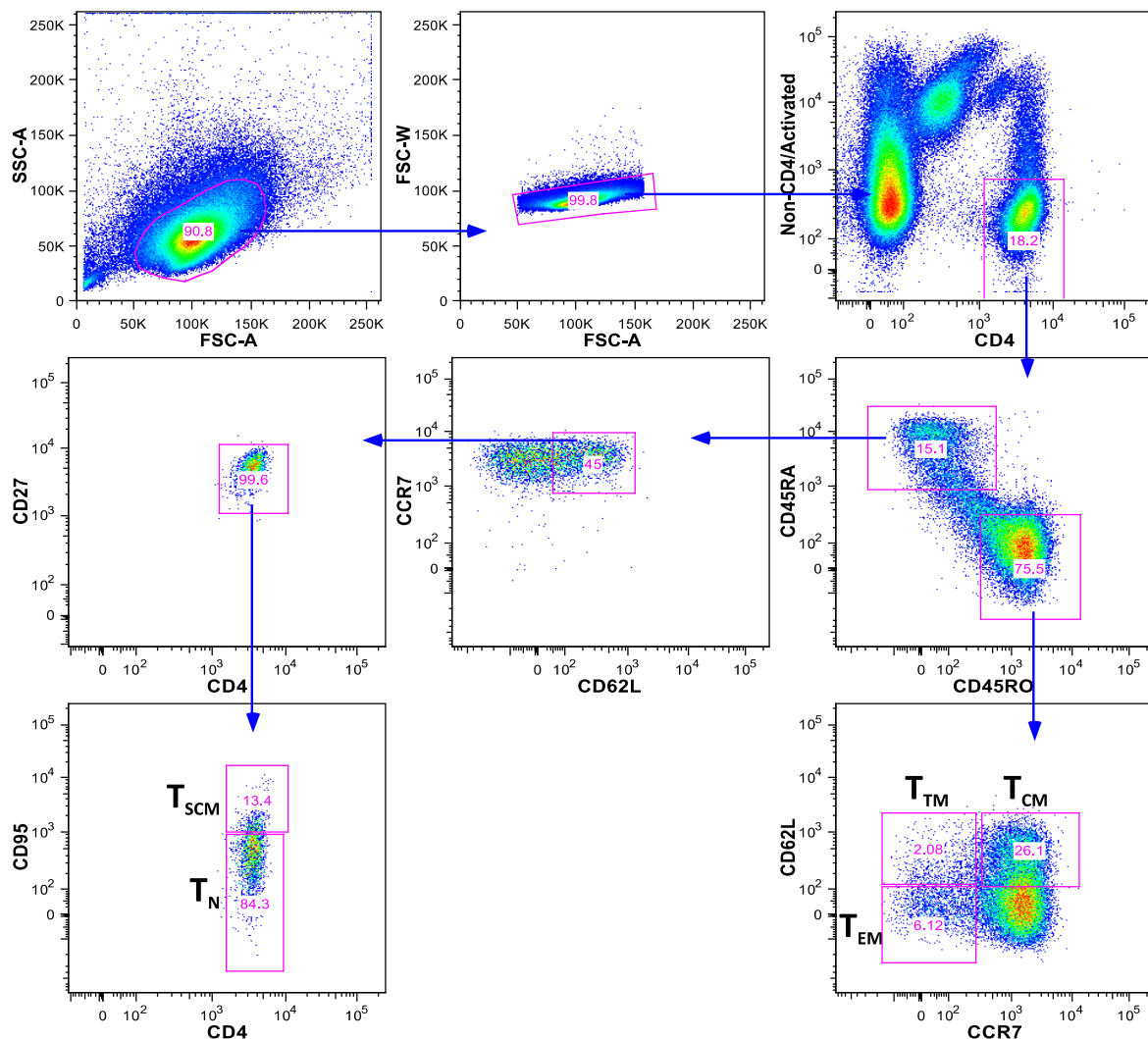


Abbildung 26: Sortierung der Patientenprobe 2 mittels FACS

Gating-Strategie zur Sortierung von CD4-angereicherten PBMCs in die Subpopulationen T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{TM} und T_{EM} der CD4⁺ T-Gedächtniszellen. Beispiel eines Ergebnisses einer Sortierung anhand des Patienten 2. Zunächst Auswahl der Lymphozyten anhand Vorwärts- (SSC) und Seitwärtsstreulicht (FSC). Anschließend Gating einzelner Zellen und Ausschluss aktivierter, sowie CD4⁻ Zellen. Dann Sortierung in die einzelnen Subpopulationen anhand des Phänotyps.

Die Ergebnisse der Sortierung sind in Tabelle 25 dargestellt. Da das FACSAria II nur vier Subpopulationen parallel sortieren kann, wurden entweder in insgesamt zwei Durchläufen die Populationen mit der größten Anzahl an Zellen zu 50% gesammelt oder zwei Subpopulationen vereint, um einen Zellverlust bei niedrigen Zellzahlen zu vermeiden. Für Patient 1 konnte mit Abstand die höchste Zellzahl sortiert werden, gefolgt von Patient 3 und 5. Für die Patienten 2 und 4 konnten nur wenige Zellen analysiert werden.

Tabelle 25: Zellzahlen der einzelnen Subpopulationen pro Patient

Patienten ID	T_N	T_{SCM}	T_{CM}	T_{EM}	T_{TM}	Besonderheit
1	732616	334141	515679	24302	5174	T _{EM} /T _{TM} gepoolt
2	3113	2749	8294	2382	643	T _{CM} /T _{EM} zu 50 % gesammelt
3	19761	339	5908	1875	125	T _{EM} /T _{TM} gepoolt
4	5875	1203	-	130271	137	Keine T _{cm}
5	166531	58223	304529	191192	136526	T _{CM} /T _{EM} zu 50 % gesammelt

Die sortierten Zellpopulationen wurden im Anschluss zu maximal 1×10^5 aliquotiert und gegebenenfalls mit CrFK Zellen aufgefüllt. Nach der Lyse der Zellen wurden diese mittels HIV-1/CCR5 qPCR analysiert. Die Ergebnisse der CCR5 Quantifizierung können der Abbildung 27 entnommen werden. Die Wiederfindungsrate für CCR5 schwankte sehr stark zwischen 0 % und 140 %. Wobei die Proben mit einer niedrigen Zellzahl die schlechtesten Werte aufwiesen.

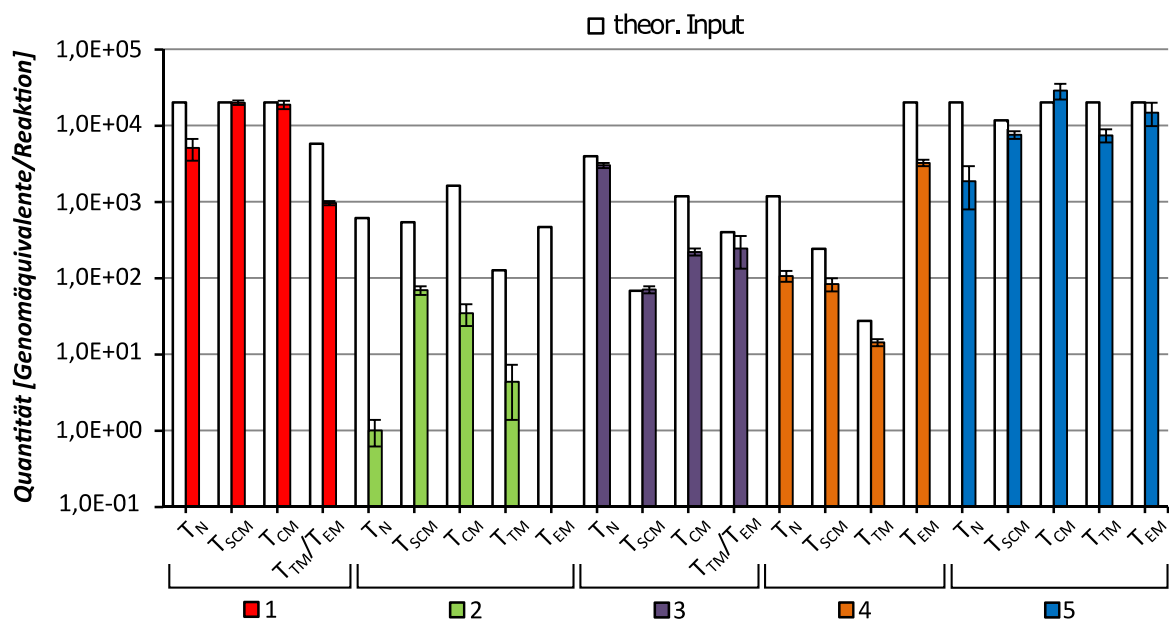


Abbildung 27: Ergebnisse der CCR5 Quantifizierung von Patientenproben mittels qPCR

Für die Patienten wurden die verschiedenen CD4⁺ Gedächtniszell Subpopulationen mittels HIV-1/CCR5 qPCR untersucht (T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM}, T_{TM}). Angabe des theoretischen Inputs an Zellen in Weiß.

Bei den Patienten 3 und 4 konnten in verschiedenen Subpopulationen HIV-1 nachgewiesen werden (Abbildung 28). In jeder untersuchten Subpopulation von CD4⁺ Gedächtniszellen des Patienten 4 konnten geringe Mengen an HIV-1 detektiert werden, diese lagen jedoch unter der Quantifizierungsgrenze der qPCR. Für Patient 5 konnten in den T_{TM} im Mittel 17 Kopien HIV-1 pro Replikat gemessen werden.

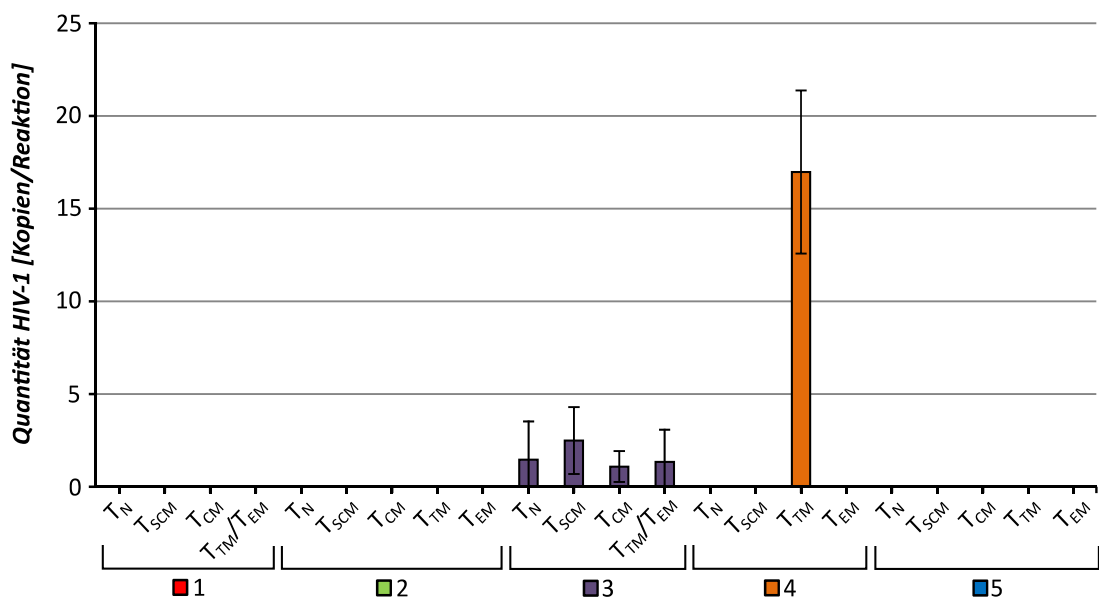


Abbildung 28: Ergebnisse der HIV-1 Quantifizierung von Patientenproben mittels qPCR

Darstellung des Mittelwerts der qPCR Replikate sowie deren Standardabweichung.

Die qPCR Ergebnisse wurden zusätzlich mittels nested-PCR überprüft. In Abbildung 29 veranschaulicht, dass die HIV-1 Messungen für Patient 3 und 4 bestätigt werden konnten, während die anderen Proben negativ verblieben.

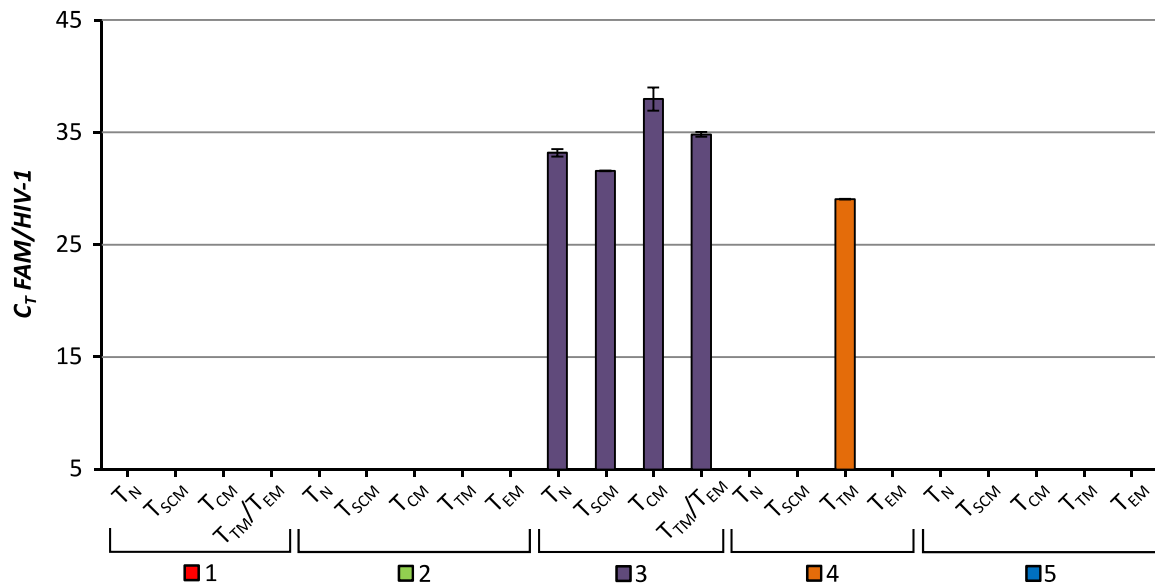


Abbildung 29: Ergebnisse der nested-PCR mit sortierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen von HIV-1 Langzeitpatienten

Es ist jeweils der Mittelwert des C_T-Wertes von HIV-1 der qPCR Replikate dargestellt, sowie die zugehörige Standardabweichung.

4.7 ddPCR als alternative Quantifizierungsmethode

4.7.1 Übertragung des HIV-1/CCR5 qPCR Assays auf ddPCR

Die ddPCR stellt eine alternative Quantifizierungsmethode zur qPCR dar. Es sollte zunächst getestet werden, ob der HIV-1/CCR5 qPCR Assay auf die ddPCR übertragbar ist. Die eigentliche Amplifikation der Ziel-DNA findet bei dieser Methode in Öl-Tröpfchen mit einem Volumen von 1 nl statt. Genutzt wird eine neuartige Chemie, die diese Tröpfchenbildung und deren Stabilität garantiert. Aufgrund dieser veränderten Bedingungen muss gegebenenfalls das Temperaturprotokoll und die Konzentration von Primern und Sonden verändert werden.

Die Konzentration der Primer und Sonden wurde nach Herstellerempfehlung angepasst. Um die optimale Annealing-Temperatur für die genutzten Primer zu ermitteln, wurde eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt. Es wurden je 330 ng PBMC DNA mit 50 Kopien des pNL4-3 Plasmids getestet. Der Temperaturgradient wurde von 58 °C bis 62 °C angesetzt. Abbildung 30 lässt erkennen, dass die Temperaturveränderungen keinen Einfluss auf die Quantifizierung von CCR5 hatten, jedoch auf HIV-1. Bei 58 °C wurden circa 65 Kopien HIV-1 gemessen, während die 59 °C bis 62 °C nur zu einer Quantifizierung von ca. 18 Kopien führten.

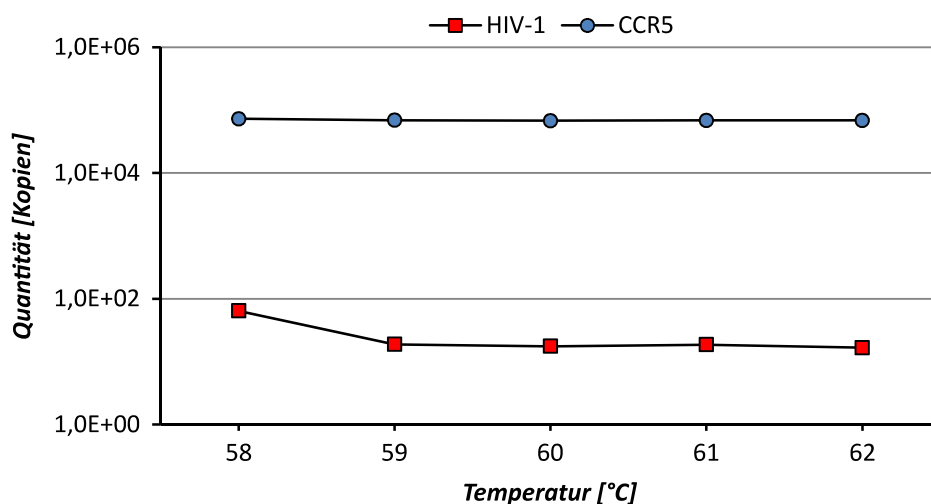


Abbildung 30: Temperaturgradienten-PCR mit PBMC DNA und pNL4-3 Plasmid-DNA

Darstellung des Mittelwerts der PCR Replikate und deren Standardabweichung. Gemessen wurde die Kopienzahl an HIV-1 (hellgrau) und CCR5 (dunkelgrau) mittels ddPCR.

Um die Genauigkeit der ddPCR Quantifizierung zu analysieren, sowie einen Testlauf mit Zelllysate durchzuführen, wurden 330 ng extrahierte ACH-2 DNA in Wasser und in Zelllysate von 5×10^5 CrFK Zellen gemischt. Die Proben wurden dann mittels ddPCR analysiert. Abbildung 31 zeigt die erfolgreiche Quantifizierung der ACH-2 DNA in Wasser. ACH-2 Zellen beinhalten laut Literatur genau eine Kopie HIV-1, dies konnte anhand dieser Messung nachvollzogen werden. Die Probe mit dem Zelllysate konnte aufgrund einer niedrigen Dropletzahl nicht ausgewertet werden (Abbildung 31, Teil B). Für ein auswertbares Ergebnis, müssen mindestens 1×10^4 Droplets analysiert werden können.

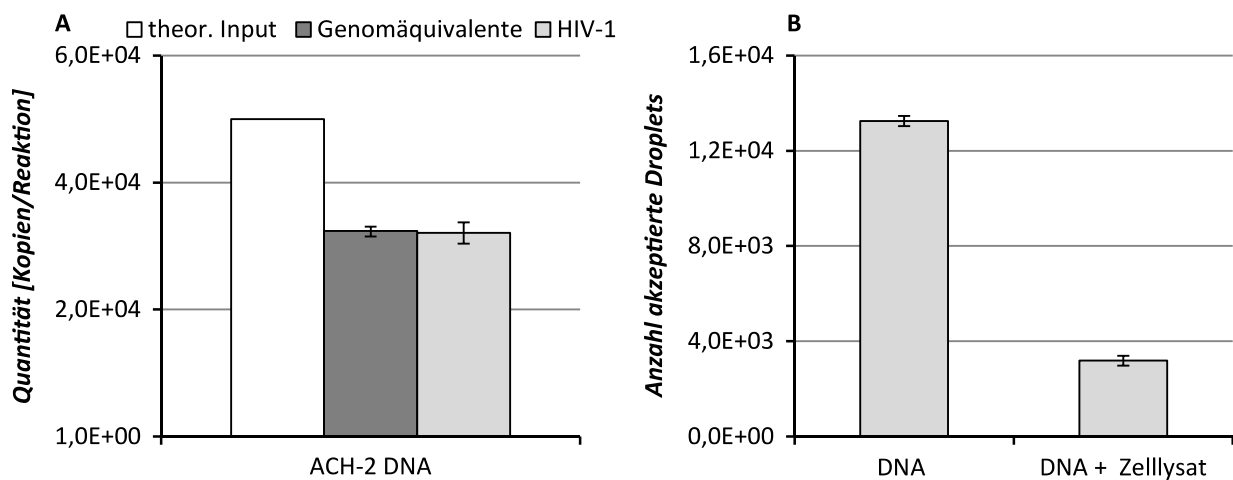


Abbildung 31: ddPCR mit ACH-2 DNA in H_2O bidest. und in Zelllysate

A) Quantifizierung von CCR5 (dunkelgrau) und HIV-1 (hellgrau) mittels ddPCR. Darstellung des Mittelwerts der Replikate, sowie deren Standardabweichung.

B) Anzahl akzeptierter Droplets für die Proben mit ACH-2 DNA in H_2O bidest. und ACH-2 DNA in CrFK Zelllysate. Mittelwert der akzeptierten Droplets pro Replikat und deren Standardabweichung.

4.7.2 Vergleich qPCR und ddPCR

Um einen Vergleich zwischen der qPCR und der ddPCR herstellen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von ACH-2 DNA in C8166 DNA hergestellt und aliquotiert. Die Verdünnungsreihe reichte von 1×10^0 bis 1×10^3 Kopien HIV-1/ μl in 66 ng C8166 DNA/ μl . Die Ergebnisse können der Abbildung 32 entnommen werden. Für jede Verdünnungsstufe konnte mit beiden Geräten HIV-1 gemessen werden. Die qPCR detektierte im Vergleich mit der ddPCR sowohl für HIV-1 als auch für CCR5 eine höhere Anzahl an Kopien pro Verdünnungsstufe.

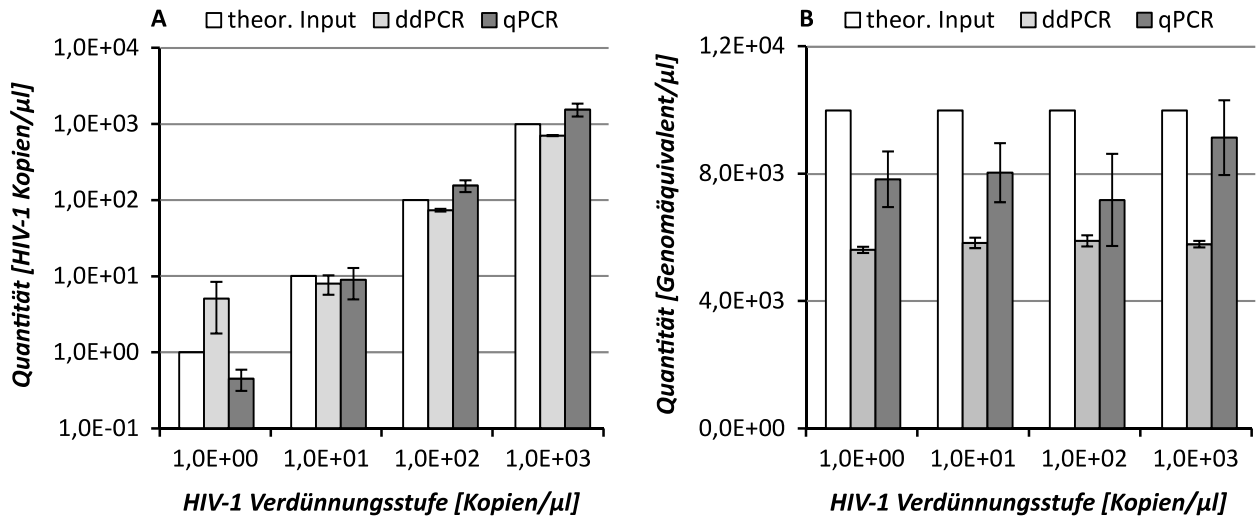


Abbildung 32: Vergleich ddPCR und qPCR

A) Quantifizierung von HIV-1 mittels ddPCR (hellgrau) und qPCR (dunkelgrau). Dargestellt ist der Mittelwert zweier Messungen und deren Standardabweichung.

B) Quantifizierung der Genomäquivalente mittels ddPCR (hellgrau) und qPCR (dunkelgrau).

5 Diskussion

Eine effektive HAART führt bei vielen HIV-infizierten Patienten zu einer Reduzierung der Plasmavirämie bis unter die Nachweisgrenze, kann jedoch keine Eradikation des Virus erwirken. Die latente Infektion von ruhenden CD4⁺ T-Gedächtniszellen ermöglicht dem HIV-Virus eine lebenslange Persistenz in infizierten Individuen. Dieses äußerst stabile Virusreservoir wird als eine der größten Hürden bei der Eradikation von HIV angesehen. Aus diesem Grund hat die Entwicklung eines geeigneten Assays zum Nachweis und zur Charakterisierung des proviralen Reservoirs eine hohe Priorität in der HIV-Forschung [41]. Eine effiziente Messung von HIV-1 DNA innerhalb verschiedener Subpopulationen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen ist nötig, um diese zu ermöglichen. Darüber hinaus können wichtige Informationen über den proviralen Status einzelner Patienten gesammelt werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Methoden zur Realisierung eines Ablaufs zur Quantifizierung von Proviren in Subpopulationen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen optimiert oder etabliert und zu einem zusammenhängenden Workflow vereint. Anhand DNA-Proben und *in vitro* infizierten Zellen konnten Teile oder der gesamte Ablauf getestet werden. Desweiteren wurden Vollblutproben von sechs langzeitinfizierten HIV-1 Patienten zur Charakterisierung des proviralen HIV-1 Reservoirs analysiert.

5.1 Verbesserte Probenvorbereitung durch Anpassung der Lysebedingungen

Die direkte Lysemethode nach Behrend *et al.* stellte sich in vorausgegangenen Arbeiten als einzig taugliche Methode zur Extraktion von DNA aus PFA fixierten Zellen heraus [78]. Aufgrund des großen Lysevolumens ergibt sich jedoch ein hoher Verdünnungseffekt der Probe. Dies bedingt den Einsatz großer PCR-Ansätze mit gleichzeitig niedriger Konzentration an Ziel-DNA pro Reaktion. Eine Reduzierung des Lysevolumens zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Lyseeffizienz und konnte somit erfolgreich realisiert werden (Abbildung 9). Eine Angleichung der Zellzahl in jeder Probe hat gleich mehrere positive Effekte. Zum einen kann die Lyse immer unter gleichen Bedingungen ablaufen, zum anderen kann der Einsatz größerer Mengen Zellen mögliche Verluste von genetischem Material vermeiden. So können Effekte wie die enzymatische Degradierung oder Adsorption von DNA an Polypropylen bei geringen Zellzahlen beziehungsweise DNA Mengen vermindert werden [80]. Es eignen sich jedoch nur solche Zellen als „Füllmaterial“, die das Ergebnis der nachfolgenden Analysen nicht verfälschen. Der Einsatz von CrFK Zellen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf

die Lyseeffizienz oder das Fluoreszenzsignal von HIV-1 oder CCR5 in der qPCR (Abbildung 11). Eine Erprobung der neuen Lysebedingungen konnte mit einer bereits getesteten Patientenprobe erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 12). Bei diesen Proben ergab sich im Vergleich mit einer vorherigen Analyse eine erhöhte Wiederfindungsrate, was für den Einsatz der neuen Lysebedingungen spricht.

Die direkte Lysemethode ermöglicht die Extraktion von genetischem Material aus PFA fixierten Zellen. Die Fixierung ist nötig, da eine Sortierung von lebenden HIV-infizierten Zellen aufgrund einer Infektionsgefahr durch Aerosolbildung auf Labore mit der Sicherheitsstufe 3 beschränkt ist [81]. Innerhalb dieser Arbeit schwankt die Wiederfindungsrate sehr stark und erreicht selten einen Wert über 60%. Die gängigen säulenbasierten Kits zeigten bei vorausgegangenem Arbeiten eine noch schlechtere DNA-Ausbeute mit fixiertem Material. Aufgrund der niedrigen Frequenz von Proviren in CD4⁺ T-Gedächtniszellen und der Untersuchung von geringen Probenmengen könnte dieser Verlust zu einer verringerten Detektionsrate führen. Der Grund für diese schlechte Ausbeute scheint in der Fixierung der Zellen zu liegen. Es ist weitreichend bekannt, dass Formaldehyd-Fixierung die Struktur, sowie die Integrität von DNA verändert und die Extraktion erschwert [82, 83]. So zeigten Russell *et al.* in einem Vergleich von fixierten und unfixierten simianen PBMCs eine tendenziell schlechtere DNA-Ausbeute für die fixierten Zellen [84]. Im Vergleich mit dieser Arbeit wurde eine geringere PFA Konzentration und eine kürzere Inkubationszeit angewandt. Alternative Fixierungsmethoden könnten zu einer höheren DNA Ausbeute führen, so wie in einem ersten Vergleich eine Methanolfixierung bessere Werte auf (Daten nicht gezeigt). Eine Sortierung von lebenden Zellen würde den Vorteil einer simpleren und effizienteren DNA-Extraktion mit sich ziehen. Hier wäre ein kommerzielles Extraktionskit die Methode der Wahl, da diese laut Hersteller eine hohe Ausbeute von bis zu 90% versprechen.

5.2 qPCR zur Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 in einem Ansatz

Der qPCR Assay zur Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 in einer Reaktion erlaubt die Messung von HIV-1 Proviren und die gleichzeitige Normalisierung der Probe bezüglich der Zellzahl [73]. Der Vorteil einer Duplex-qPCR ergibt sich nicht nur durch eine erleichterte Probenvorbereitung und Kosteneinsparungen, sondern auch daraus, dass nun die gesamte Probe auf HIV-1 Proviren untersucht werden kann. Dies zahlt sich vor allem bei geringen Probenmengen aus.

Für eine absolute Quantifizierung mittels qPCR ist eine akkurate Standardreihe essentiell. Bei zehnfach Verdünnungen von Plasmid-DNA liegen die C_T -Werte optimalerweise 3,3 Zyklen auseinander. Dies würde einer Effizienz von 100% entsprechen. Werte zwischen 90% und 110% gelten jedoch als ausreichend. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Parameter ist das Bestimmtheitsmaß (R^2), welches gegen 1 strebt und einen Wert von 0,98 nicht unterschreiten sollte. Alle in dieser Arbeit hergestellten Standardreihen wiesen optimale Werte für die Messungen auf (Abbildung 8 und 13). Bei sehr niedrigen Kopienzahlen muss jedoch eine hohe Varianz zwischen den Replikaten aufgrund der Poisson-Verteilung beachtet werden.

Für die Messung proviraler HIV-1 DNA in Patientenproben ist die Sensitivität der qPCR ein entscheidender Punkt. Ein guter Assay muss eine einzelne Kopie HIV-1 detektieren können. Eine Analyse der niedrigsten Verdünnungsstufe des Standards mit einer theoretischen mittleren Kopienzahl von 0,4 HIV-1/CCR5 Kopien zeigte eine Übereinstimmung mit der Poisson-Verteilung ($\lambda = 0,48$ bzw. 0,55, siehe Abbildung 14). Dies zeigt, dass das Detektionslimit dieses Assays bei einer einzelnen Kopie HIV-1/CCR5 liegt und es sich um einen akkuraten Standard zur Quantifizierung handelt. Für weitere Analysen der Sensitivität wurden ACH-2 Zellen genutzt, die sich durch ein integriertes Provirus pro Genom als Modell eignen [85]. Sowohl mit extrahierter DNA, als auch mit einer Verdünnungsreihe von fixierten Zellen zeigte sich, dass eine Detektion von einzelnen Kopien HIV-1 möglich ist (Abbildung 15 und 16). Der Nachweis einer einzelnen Zelle mit einem Provirus in Patientenmaterial würde jedoch voraussetzen, dass das gesamte genetische Material ohne Verlust in die qPCR überführt werden kann und, dass es in den Kontrollen zu keiner falsch-positiven Detektion kommt

Die qPCR ist eine häufig genutzte Methode zur Quantifizierung proviraler DNA. Desire *et al.* publizierten eine TaqMan qPCR für HIV-1 Subtyp B, die eine konservierte Region im *pol*-Gen amplifiziert [86]. Auch mit dieser PCR konnte eine Sensitivität von einer einzelnen Kopie HIV-1 pro Ansatz gezeigt werden. Ometto *et al.* nutzen ebenfalls Primer, die eine Sequenz des *gag*-Gens amplifizieren, hier konnte eine Sensitivität von 1,2 Kopien HIV-1 pro Ansatz gezeigt werden [87]. Als Standard wurde eine serielle Verdünnung extrahierter genomischer DNA verwendet. Die innerhalb dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse und die oben genannten Beispiele zeigen, dass sich die qPCR als sensitive Methode zur Quantifizierung geringer Mengen HIV-1 Kopien und somit zur Charakterisierung des proviralen Reservoirs eignet.

Der in dieser Arbeit genutzte Assay quantifiziert die totale HIV-1 DNA. Es wird keine Unterscheidung zwischen integrierten und nicht-integrierten Proviren vorgenommen, was zu einer Überquantifizierung des Reservoirs führen kann [88]. Aus diesem Grund wird häufig ein Assay genutzt, das nur integrierte Proviren quantifiziert [89-91]. Eine Möglichkeit ist die Etablierung der von Liszewski *et al.* entwickelten *Alu-gag* nested-PCR, die eine Sensitivität von 0,5 Proviren pro 1×10^4 Zellen untersuchte Zellen aufweist [91]. Der größte Nachteil jeder PCR-basierten Detektionsmethode ist die fehlende Unterscheidung zwischen replikationskompetenten Proviren und defekten Proviren [92]. Ein großer Teil der Zellen trägt defekte Proviren, die nicht mehr zu einer aktiven Virusreplikation fähig sind [93, 94]. Generell stehen zur Quantifizierung der HIV-1 Persistenz sowohl PCR-basierte Methoden als auch das *Quantitative Viral Outgrowth Assay* (Q-VOA) zur Verfügung [95, 96]. Diese Methode detektiert ausschließlich replikationskompetente Proviren. Eriksson *et al.* zeigten einen Unterschied von bis zu 2 log-Stufen zwischen dem Q-VOA und PCR-basierten Methoden [92]. Der Vorteil einer qPCR ergibt sich neben einem geringeren Arbeitsaufwand auch durch die mögliche Untersuchung kleiner Mengen Blut und auch fixierter Zellen.

5.3 Etablierung einer nested-PCR zum hochsensitiven Nachweis von HIV-1

Die HIV-1/CCR5 qPCR zeigte zwar bei den Analysen eine äußerst hohe Sensitivität, die C_T -Werte lagen bei den niedrigsten Verdünnungsstufen jedoch meist über 40 Zyklen (Vergleich Abbildung 15 und 16). Bei solch hohen C_T -Werten können falsch-positive Signale nicht ausgeschlossen werden, die durch unspezifische Amplifikationen oder Primer-Dimer entstehen. Aus diesem Grund wird sogar häufig ein Cut-Off Wert gewählt, ab welchem die Messung als negativ gewertet wird. Bei der Verwendung von krudem Zelllysate könnte die empfindliche Reaktion darüber hinaus in ihrer Effizienz gestört sein. Um eine hohe Spezifität bei Patientenproben zu garantieren wurde eine nested-PCR etabliert. Diese kann zur Verifizierung von qPCR Daten eingesetzt werden. Einer nested-PCR wird eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität zugeschrieben, daher handelt es sich um eine oft genutzte Methode zur Detektion proviraler HIV-1 DNA [89, 97]. Pasternak *et al.* etablierten beispielsweise eine seminested-PCR, da eine qPCR keine zufriedenstellende Sensitivität zur Quantifizierung von HIV-1 RNA und DNA erreichte [97]. Da die in dieser Arbeit genutzte HIV-1/CCR5 qPCR jedoch eine ausreichende Sensitivität aufweist, wird die nested-PCR ausschließlich zur Validierung der Daten genutzt.

Die Voramplifikation der Ziel-DNA durch eine konventionelle PCR erzeugt eine Verstärkung des Fluoreszenzsignales in der qPCR. Bei dem Einsatz der HIV-1/CCR5 Standardreihe in der nested-PCR zeigt sich eine erfolgreiche Verschiebung des C_T -Wertes um 12 - 13 Zyklen (Abbildung 19). Es kommt daher durch die out-PCR zu einer Vervielfältigung der DNA von ungefähr 4-log Stufen. Die Analyse von niedrigen Kopienzahlen HIV-1 mit extrahierter DNA zeigte zudem eine äußerst hohe Sensitivität (Abbildung 20). Auch bei zehnfachen Verdünnungen von ACH-2 Zellen konnte in jeder Stufe erfolgreich ein Signal erzeugt werden, welches im Vergleich mit der qPCR eine deutliche Verschiebung zu einem niedrigeren C_T -Wert aufzeigte (Abbildung 21). Es war jedoch keine akkurate Quantifizierung der CCR5 DNA mehr möglich, da die Voramplifikation der HIV-1 DNA die Effizienz der CCR5 Amplifikation stark beeinträchtigt. Die nested-PCR eignet sich sehr gut, um gewonnene Ergebnisse zu verifizieren. Durch die hohe Sensitivität wird sie häufig auch zur Quantifizierung eingesetzt. So entwickelten beispielsweise Vandergeeten *et al.* verschiedene nested-qPCRs zur Messung der totalen, integrierten DNA und 2-LTR Zyklen [98]. Die Quantifizierung wird durch eine serielle Verdünnung von ACH-2 Zellen realisiert. Auch bei der hier eingesetzten nested-PCR kann eine Quantifizierung durch die Nutzung eines Standards erreicht werden. Ein häufiger Kritikpunkt der nested-PCR ist die hohe Kontaminationsgefahr. Durch ein sehr präzises Handling und eine strenge Routine können Kontaminationen verhindert werden.

5.4 Quantifizierung von HIV-1 Proviren in infizierten PBMCs

Die *in vitro* Infektion von PBMCs wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um den gesamten Ablauf zur Quantifizierung von HIV-1 Proviren in Subpopulationen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen zu erproben. Außerdem erlaubt es einen Vergleich der *in vitro* Infektion mit dem bekannten Wissen über die Infektion von CD4⁺ T-Gedächtniszellen *in vivo*. Um eine aktive Replikation von HIV-1 zu ermöglichen, müssen die Zellen stimuliert werden. Die Nutzung von PHA und IL-2 führt zu einer Aktivierung, Proliferation und Hochregulation der zur Infektion benötigten Rezeptoren, sowie Transkriptions- und Replikationsfaktoren [99, 100]. Mittels qPCR und p24 ELISA konnte die erfolgreiche Infektion der Zellen bestätigt werden (Abbildung 22). Eine Sortierung der Zellen ergab einen deutlichen Überschuss an T_{CM} , während die kleinste Population die T_N und T_{TM} darstellten, die aufgrund ihrer niedrigen Zellzahl vereint wurden (Tabelle 23). Bei der Sortierung einer Patientenprobe würde man einen weit höheren Anteil an T_N erwarten, der hier aufgrund der Stimulation nicht mehr gegeben ist. In den sortierten Zellen konnte in jeder Subpopulation HIV-1 mittels

HIV-1/CCR5 qPCR quantifiziert werden (Abbildung 23). Dabei ergaben sich teilweise drastische Unterschiede der Frequenz der HIV-1 DNA von Subpopulation zu Subpopulation (Abbildung 24). In den T_{SCM} konnte die mit Abstand niedrigste Frequenz von HIV-1 DNA gemessen werden. In einer Studie von Holl *et al.*, bei der ebenfalls PHA und IL-2 genutzt wurde, zeigte sich, dass zum großen Teil die $CD45RO^+$ Zellen mit HIV infiziert waren [101]. T_{SCM} gehören neben den T_N zu den $CD45RA^+$ Zellen. Hier wurde jedoch eine Infektionszeit von 24 Stunden angesetzt und keine Unterscheidung zwischen T_N und T_{SCM} vorgenommen. Tabler *et al.* zeigten eine signifikant niedrigere Infektionsrate bei infizierten T_{SCM} gegenüber den anderen Subpopulationen von Gedächtniszellen, im Vergleich mit den T_N zeigte sich eine höhere Infektionsrate [102]. Mögliche Erklärungen liefern ein niedrigeres Level an CCR5 Expression und eine Restriktion der Infektion durch SAMHD1. Auch *in vivo* Studien zeigen, dass die Anzahl an gemessenen Proviren in den $CD45RO^+$ Zellen die Anzahl in den $CD45RA^+$ Zellen um ein Vielfaches übersteigt [65, 103-105]. Schnittman *et al.* konnte diese Erkenntnis sowohl für eine *in vitro* Infektion, als auch für die *in vivo* Situation bestätigen [105]. Hier muss jedoch auch wieder bedacht werden, dass keine Unterscheidung zwischen T_N und T_{SCM} vorgenommen wurde.

Der Ablauf zur Quantifizierung von HIV-1 Proviren in $CD4^+$ T-Gedächtniszellen konnte erfolgreich erprobt werden. Auch in Proben mit niedrigen Zellzahlen konnte eine erfolgreiche Quantifizierung durchgeführt werden. Durch die Tatsache, dass es sich hier um eine direkte Infektion von aktivierten PBMCs handelt, eignet sich diese Methode gut um den Ablauf zu erproben, stellt jedoch kein Modell zur Untersuchung der HIV Latenz in ruhenden $CD4^+$ T-Gedächtniszellen dar.

5.5 Quantifizierung von HIV-1 Proviren in Patientenproben

Die Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 wurde exemplarisch an zwei Patienten der HIV-1 Serokonverterstudie ausgetestet. Dabei handelt es sich um eine Studie des RKIs die Langzeitbeobachtungen des Verlaufes von HIV-Infektionen mit Patienten durchführt, deren Infektionszeitpunkt bekannt ist. Für den ersten Patienten mit einer relativ niedrigen Viruslast konnte nur mittels nested-PCR HIV-1 DNA nachgewiesen werden (Abbildung 25). Für den zweiten Patienten mit einer hohen Viruslast konnte schon in der qPCR HIV-1 DNA detektiert werden. Die gemessenen HIV-1 Kopien korrelieren mit der RNA-Viruslast der Patienten.

Fünf Vollblutproben von langzeitinfizierten HIV-1 Patienten konnten auf die Proviruslast in Subpopulationen der CD4⁺ T-Gedächtniszellen untersucht werden. Die Sortierung der Zellen zeigte keine übereinstimmenden Mengenverhältnisse der verschiedenen Subpopulationen von Patient zu Patient, sondern sogar relativ große Schwankungen (Tabelle 25). Diese Beobachtung findet sich auch in der Literatur wieder. So zeigt Chomont *et al.* bei der Untersuchung von 31 HIV-1 Patienten, dass sich der Anteil der T_N zwischen 5 – 40% bewegt, der T_{CM} 15 – 65%, den T_{TM} wiederum wurden 15 – 45% und den T_{EM} 1 – 45% zugeschrieben [106]. Der genaue Grund für diese Schwankungen ist ungeklärt.

Bei der qPCR zeigten sich ebenfalls große Schwankungen in der Wiederfindungsrate von CCR5 (Abbildung 27). Generell konnte beobachtet werden, dass sich bei niedrigen Zellzahlen eine schlechtere Rate ergab. Dies kann durch einen Zellverlust während der Probenvorbereitung oder die PFA Fixierung erklärt werden, ein Verlust an genetischem Material fällt bei niedrigen Zellzahlen mehr ins Gewicht.

Für den Großteil der Patienten konnte sowohl per qPCR als auch mit nested-PCR keine provirale HIV-1 DNA gemessen werden (Abbildung 28 und 29). Die Frequenz an HIV-1 Proviren in den CD4⁺ T-Gedächtniszellen kann sehr niedrig sein und von Patient zu Patient stark schwanken, so dass es durchaus möglich ist, dass kein HIV-1 detektiert werden kann, obwohl der Patient latent-infizierte Zellen in sich trägt. In der Studie von Chomont *et al.* zeigte sich eine Frequenz von 0 bis 1×10^4 Proviren pro 10^6 Zellen innerhalb der Subpopulationen, wobei eine Anzahl ab 10^3 Proviren relativ selten vorkam [106]. Buzon *et al.* zeigte ähnliche Ergebnisse, hier schwankte die Zahl an HIV-1 DNA jedoch zwischen 10^1 und 10^5 pro 10^6 Zellen [107]. Kambaba-Mukadi *et al.* konnten in 10^6 der CD4⁺ T-Zellen von 45 Patienten zwischen 6 und 4×10^4 Kopien HIV-1 messen, wobei 23 Patienten unter der Quantifizierungsgrenze von 5 Kopien/PCR Reaktion lagen [108]. Die Größe des Reservoirs in HIV-infizierten Patienten hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. So wird zum Beispiel dem Startzeitpunkt der antiretroviralen Therapie eine wichtige Rolle zugeschrieben [109-111]. Unter erfolgreicher Langzeittherapie spielt vermutlich die homeostatische und antigen-gesteuerte Proliferation der latent-infizierten CD4⁺ T-Gedächtniszellen eine Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung, sowie der Größe des Reservoirs [106, 112, 113].

Für zwei Patienten konnte provirale HIV-1 DNA nachgewiesen werden (Abbildung 28). Dies zeigt die Anwendbarkeit der Methode für weitere Untersuchungen. In jeder untersuchten Subpopulation des Patienten 3 konnten kleine Mengen an Proviren quantifiziert werden, wobei sich keine großen Unterschiede in den Mengenverhältnissen ergaben. Für

den Patienten 4 hingegen konnte ausschließlich in den T_{TM} eine sehr hohe Menge an HIV-1 DNA gemessen werden. In den Studien von Buzon, Chomont und Jaafoura *et al.* konnten ebenfalls in allen untersuchten Subpopulationen Proviren detektiert werden [56, 106, 107]. Chomont *et al.* zeigte zusätzlich, dass die T_{CM} , bei Patienten mit einer hohen Zahl an $CD4^+$ T-Zellen und einem frühen Start der HAART, das Hauptreservoir darstellen [106]. Diese Zellen gelten als sehr langlebig und stabil. Bei Patienten mit geringen $CD4^+$ Zellzahlen, ergaben sich die T_{TM} als Hauptreservoir. Diese Zellen proliferieren ständig in einem geringen Maße, dies führt zu einer stabilen Persistenz von HIV. Bei Buzon stellten sich die T_{SCM} als das stabilste Reservoir heraus, im Vergleich von Patienten die im Schnitt erst 9 Monate therapiert wurden und Langzeitpatienten (Median: 9 Jahre) [107]. Jaafoura *et al.* erzielten ähnliche Ergebnisse und kamen zu dem Schluss, dass sich das virale Reservoir im Laufe der Zeit auf die wenig differenzierten, äußerst langlebigen T_{SCM} und T_{CM} reduziert [56]. Für den Patienten 3 kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Subpopulation zum größten Teil zum latenten HIV-Reservoir beiträgt. Bei dem Patienten 4 kann man den T_{TM} die größte Rolle zuweisen, was sich mit den Erkenntnissen von Chomont *et al.* deckt [106]. Die Ergebnisse konnten zusätzlich mittels nested-PCR verifiziert werden (Abbildung 29).

5.6 ddPCR als alternative Quantifizierungsmethode

Eine alternative Methode zur absoluten Quantifizierung von DNA mittels qPCR bietet die digitale PCR. So konnte im Rahmen dieser Arbeit die ddPCR von Bio-Rad getestet werden. Der Assay zur Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 konnte mit einigen Modifizierungen auf das neue System übertragen werden. Die Übertragbarkeit von qPCR Assays ist ein häufig genannter positiver Aspekt der ddPCR. Eine Analyse mit extrahierter ACH-2 DNA zeigte die erfolgreiche Quantifizierung von HIV-1 und CCR5, wobei ein 1:2 Verhältnis detektiert werden konnte (Abbildung 31). Dieses Ergebnis stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Eigenschaft einer integrierten HIV-1 Kopie im ACH-2 Genom überein [85]. Eine Analyse mit krudem Zelllysate erbrachte leider kein Ergebnis, da nur eine niedrige Droplet Anzahl gemessen werden konnte. Zelllysate stört scheinbar die Generierung der Droplets oder deren Stabilität, der Grund dafür könnten beispielsweise Zellbestandteile sein, die im Lysat zurückbleiben. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Versuche mit Zelllysate, von Herstellerseite wird die Nutzung nicht empfohlen. Bei der Einführung der ddPCR ist es daher essentiell, eine alternative Methode zur Extrahierung der DNA in den Workflow zur

Quantifizierung von HIV-1 Proviren zu integrieren. Ein Vergleich von qPCR und ddPCR mit verschiedenen Konzentrationen HIV-1 DNA in einem hohen genomischen Hintergrund zeigte für beide Methoden ähnliche Ergebnisse (Abbildung 32). Unterschiede in hohen Verdünnungsstufen von HIV-1 (10^3 bis 10^1 HIV-1 Kopien/ μ l) waren minimal. Die ddPCR zeigte jedoch eine deutliche Überquantifizierung in der niedrigsten Verdünnungsstufe (10^0 HIV-1 Kopien/ μ l). Bosman *et al.* zeigen bei einem Vergleich der ddPCR mit einer semi-nested qPCR zur Messung des HIV Reservoirs ebenfalls eine Überquantifizierung der ddPCR bei niedrigen Kopienzahlen [114]. Eine mögliche Begründung könnte die Detektion von falsch-positiven Droplets sein, die bei einigen Arbeitsgruppen zur Kritik führte [115-117]. Auch Kontaminationen können prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, da die ddPCR eines äußerst präzisen Handlings bedarf. Bei der Analyse der CCR5 Messdaten zeigte die ddPCR eine niedrigere Varianz im Vergleich mit der qPCR (Abbildung 32). Hindson *et al.* bestätigen diese Beobachtung [118]. Viele Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass es sich um eine Methode mit einer sehr hohen Präzision, Genauigkeit und Sensitivität handelt [114, 116, 119]. Kiselina *et al.* beschrieb eine vergleichbare Sensitivität mit der qPCR, während sich bei den Versuchen von Strain *et al.* eine höhere Sensitivität zeigte [116, 120]. Ein großer Vorteil ist die absolute Quantifizierung ohne den Gebrauch einer Standardkurve, wodurch Ungenauigkeiten aufgrund eines schlechten Standards ausgeschlossen werden [121]. Arbeitsgruppen wie Strain *et al.* und Henrich *et al.* etablierten bereits erfolgreich Assays zur hochsensitiven Analyse des HIV-1 Reservoirs [116, 122]. Bioinformatische Tools wie „definetherain“ konzentrieren sich darüber hinaus speziell auf die Detektion von niedrigen Kopienzahlen [123]. Die Methode gilt als vielversprechend vor allem zur Quantifizierung von sehr niedrigen Kopienzahlen und steht deshalb im Interesse der Erforschung des HIV-1 Reservoirs [122].

6 Zusammenfassung

Die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) ermöglicht die Suppression der Plasma-virämie eines HIV-1 Patienten bis unter die Nachweisgrenze. Eine vollständige Eradikation des Virus ist jedoch mit antiretroviralen Medikamenten alleine nicht möglich. Die größte Barriere stellen die latent infizierten, ruhenden CD4⁺ T-Gedächtniszellen dar, welche ein äußerst stabiles Reservoir bilden. Durch die Erkenntnis, dass sich die Gedächtniszellen in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad, Phänotyp und Funktionsumfang unterscheiden lassen, ist das Interesse an einer genauen Charakterisierung dieses viralen Reservoirs groß.

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung und Etablierung geeigneter PCR-Methoden zur Charakterisierung des proviralen HIV-1 Reservoirs, sowie eine darauffolgende Analyse von Patientenmaterial. Für die genutzte direkte Lyse Methode wurde das Lysevolumen im Hinblick auf die weitere Verarbeitung der Proben angepasst und eine Angleichung der Zellzahl für jede Probe etabliert. Die HIV-1/CCR5 qPCR zur Quantifizierung der proviralen HIV-1 DNA zeigte für Plasmid- und genomische DNA eine Detektionsgrenze von einer einzigen Kopie HIV-1. Zur Erhöhung der Spezifität und Validierung der mittels qPCR gewonnenen Daten, wurde eine HIV-1 spezifische nested-PCR etabliert, die ebenfalls ein Detektionslimit von einer einzelnen HIV-1 Kopie aufzeigte.

Anhand *in vitro* infizierter PBMCs konnte ein Probelauf des Workflows zur Charakterisierung des proviralen Reservoirs durchgeführt werden. Die Zellen wurden mittels FACS in die Subpopulationen T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{TM} und T_{EM} sortiert und die HIV-1 DNA mittels qPCR quantifiziert.

Im Rahmen der weiteren Evaluierung wurden DNA-Proben von zwei HIV-1 Patienten zur Verfügung gestellt, deren proviraler Status mittels qPCR und nested-PCR getestet wurde. Die hier erzielten Ergebnisse ergänzen stimmig die bereits bekannten Daten zur Viruslast im Plasma der Patienten. Zudem wurden sechs Vollblutproben von langzeitinfizierten HIV-1 Patienten aufbereitet, mittels FACS in die verschiedenen Subpopulationen sortiert und eine Quantifizierung der proviralen HIV-1 DNA mit der qPCR durchgeführt. Für zwei Patienten konnte in verschiedenen Subpopulationen virale DNA nachgewiesen werden, während die restlichen Patienten sowohl in der qPCR, als auch in der nested-PCR negativ getestet wurden. Für die ddPCR konnten erste Schritte zur Übertragung des Assays zur gleichzeitigen Quantifizierung von HIV-1 und CCR5 DNA durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit optimierten und etablierten Methoden sind geeignet zur hochsensitiven Quantifizierung von HIV-1 Proviren in Patientenmaterial und können zukünftig zur Charakterisierung des proviralen Reservoirs eingesetzt werden.

7 Abstract

The development of highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of HIV-1 infection was a major victory in the fight against HIV/AIDS, as it transformed a fatal disease into a controllable chronic infection. Despite this remarkable success, HAART alone cannot cure HIV infection and infected patients must continue taking antiviral drugs for the rest of their lives. The major barrier to eradicating HIV from the body is the persistence of latent HIV in resting CD4⁺ T memory cells. This small pool of latently infected cells remains extraordinarily stable despite successful long-term treatment. CD4⁺ T memory cells can be divided into different subpopulations with various stages of differentiation, phenotypes and functions. The particular properties of the subpopulations could play a significant role in maintaining the viral persistence and a precise characterization of the reservoir is therefore of major interest.

The aim of this thesis was the optimization and establishment of PCR-methods for the characterization of the proviral HIV-1 reservoir, as well as the analysis of patient samples. The direct lysis method used for the extraction of genetic material from fixed cells was modified to improve subsequent steps in the analysis. The HIV-1/CCR5 qPCR assay to quantify proviral HIV-1 DNA demonstrated extraordinary sensitivity, being able to detect a single copy of the viral genome. An HIV-1 specific nested-PCR was also established to further increase the specificity of the assay and was also shown to be capable of detecting a single copy of HIV-1 DNA. This facilitates the reliable detection of HIV-1 in patient samples and can be utilized to validate qPCR results. As a 'proof of principle' an *in vitro* infection of PBMCs with HIV-1_{Bal} was performed and the cells sorted by FACS into the subpopulations T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{TM} and T_{EM} before quantifying the proviral HIV-1 DNA using the HIV-1/CCR5 qPCR. Samples from different HIV-infected patients were examined. First, DNA samples from two patients with known levels of viremia involved in the RKI HIV-1 seroconverter study were successfully tested with the HIV-1/CCR5 qPCR and the nested-PCR. A further six blood samples from long-term infected HIV-1 patients under therapy were processed and sorted by FACS into the different subpopulations and their proviral DNA quantified with the HIV-1/CCR5 qPCR. Two of the patients tested positive for HIV-1, whereas the others remained negative with both the qPCR and the nested-PCR. The introduction of ddPCR at the RKI offered the opportunity to test this assay and to establish it as an alternative quantification method to be incorporated into the workflow.

8 Ausblick

Der hier etablierte Ablauf zur Quantifizierung von proviraler HIV-1 DNA in Subpopulationen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen soll in Zukunft genutzt werden, um weitere Patientenproben zu untersuchen. So kann eine möglichst genaue Aussage darüber getroffen werden, welche Subpopulationen zum Langzeitreservoir von HIV-1 beitragen. Auch ein Vergleich von kurzzeitinfierten und langzeitinfierten Patienten kann neue Erkenntnisse zur Charakterisierung des viralen Reservoirs beitragen. Der verlässliche Nachweis von HIV-1 DNA kann zudem infizierten Patienten, deren Plasmavirämie unter der Nachweisgrenze liegt, Informationen über den Verbleib des Virus im Körper liefern. Patientenproben, die bisher mit der qPCR als negativ bewertet wurden, können nun mit der nested-PCR erneut getestet werden.

Zukünftig kann die ddPCR als alternative Quantifizierungsmethode genutzt werden. Dazu sollte aber eine alternative DNA-Extraktionsmethode etabliert werden und weitere Optimierungsschritte erfolgen.

Eine Möglichkeit, lebende Zellen zu sortieren, würde einige Verbesserungen des Workflows nach sich ziehen. Zum einen könnte ein einfaches DNA-Extraktionskit genutzt werden, was die Wiederfindungsrate erhöhen und den Arbeitsaufwand der direkten Lyse ersparen würden. Zum anderen sollte dann ein Q-VOA durchgeführt werden, welches die Quantifizierung von replikationskompetenten Proviren und den Vergleich mit den Daten aus der qPCR zuließe.

Durch die Etablierung einer *Alu-gag* PCR kann ferner die Unterscheidung zwischen integrierten und nicht-integrierten Proviren vorgenommen werden.

Die genaue Charakterisierung der HIV Reservoirs kann in Zukunft zur Kontrolle und Entwicklung neuer Medikamente im Rahmen der Eradikationsstrategien beitragen. So ist beispielsweise für Strategien wie die „Shock-and-Kill“-Methode, die eine Reduzierung latent infizierter Zellen ermöglichen soll, eine genaue Identifizierung des Reservoirs essentiell.

9 Literaturverzeichnis

1. **Friedman-Kien, A., Laubenstein, L., Marmor, M., Hymes, K., Green, J., Ragaz, A., Gottlieb, J., Muggia, F., Demopoulos, R., and Weintraub, M.,** *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California.* Morbidity and Mortality Weekly Report, 1981. 30(25): p. 305-308.
2. **Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.,** *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.
3. **Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., and Weiss, R.,** *New Name for Aids Virus - What to Call the Aids Virus.* Nature, 1986. 321(6065): p. 10-10.
4. **Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L., and Montagnier, L.,** *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.* Science, 1986. 233(4761): p. 343-6.
5. **UNAIDS,** *Global Aids Update 2016.* 2016.
6. **King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J.,** *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* 2012: Elsevier Academic Press.
7. **Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E.,** *Retroviruses.* 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. **Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H.,** *Molekulare Virologie.* Vol. 3. 2010: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
9. **Weiss, R.A.,** *The discovery of endogenous retroviruses.* Retrovirology, 2006. 3: p. 67.
10. **Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Tiollais, P., and Sonigo, P.,** *Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses.* Nature, 1987. 328(6130): p. 543-7.
11. **Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M.,** *Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2.* Nature, 1987. 326(6114): p. 662-9.
12. **Hemelaar, J.,** *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic.* Trends Mol Med, 2012. 18(3): p. 182-92.
13. **Van Heuverswyn, F., Li, Y.Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W.M., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Delaporte, E., Hahn, B.H., and Peeters, M.,** *Human immunodeficiency viruses - SIV infection in wild gorillas.* Nature, 2006. 444(7116): p. 164-164.

14. **Sharp, P.M. and Hahn, B.H.**, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. 1(1): p. a006841.
15. **Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R.**, *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. 339(6223): p. 389-92.
16. **Huarte, N., Carravilla, P., Cruz, A., Lorizate, M., Nieto-Garai, J.A., Krausslich, H.G., Perez-Gil, J., Requejo-Isidro, J., and Nieva, J.L.**, *Functional organization of the HIV lipid envelope*. Sci Rep, 2016. 6: p. 34190.
17. **Gelderblom, H.R., Ozel, M., and Pauli, G.**, *Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations*. Arch Virol, 1989. 106(1-2): p. 1-13.
18. **Tran, E.E., Borgnia, M.J., Kuybeda, O., Schauder, D.M., Bartesaghi, A., Frank, G.A., Sapiro, G., Milne, J.L., and Subramaniam, S.**, *Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation*. PLoS Pathog, 2012. 8(7): p. e1002797.
19. **Frankel, A.D. and Young, J.A.**, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 1-25.
20. **Freed, E.O.**, *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. 251(1): p. 1-15.
21. **Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., and Varmus, H.E.**, *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression*. Nature, 1988. 331(6153): p. 280-3.
22. **Rosen, C.A. and Pavlakis, G.N.**, *Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression*. AIDS, 1990. 4(6): p. 499-509.
23. **Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M.E., Ghedin, E., Pumfery, A., and Kashanchi, F.**, *Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication*. Front Biosci, 2004. 9: p. 2388-413.
24. **Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C.L., and Weeks, K.M.**, *Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome*. Nature, 2009. 460(7256): p. 711-6.
25. **Iordanskiy, S. and Bukrinsky, M.**, *Reverse transcription complex: the key player of the early phase of HIV replication*. Future Virol, 2007. 2(1): p. 49-64.
26. **Jayappa, K.D., Ao, Z., and Yao, X.**, *The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. 3(1): p. 70-85.
27. **Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F.**, *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. 110(4): p. 521-9.
28. **Sundquist, W.I. and Krausslich, H.G.**, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(7): p. a006924.

29. **Freed, E.O.**, *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. 13(8): p. 484-96.
30. **Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A., and Holmes, E.C.**, *The causes and consequences of HIV evolution*. Nat Rev Genet, 2004. 5(1): p. 52-61.
31. **Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P., and Robbiani, M.**, *Current concepts of HIV transmission*. Curr HIV/AIDS Rep, 2007. 4(1): p. 29-35.
32. **Weber, J.**, *The pathogenesis of HIV-1 infection*. Br Med Bull, 2001. 58: p. 61-72.
33. **Richey, L.E. and Halperin, J.**, *Acute Human Immunodeficiency Virus Infection*. American Journal of the Medical Sciences, 2013. 345(2): p. 136-142.
34. **Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., and Fauci, A.S.**, *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. 362(6418): p. 355-8.
35. **Hazenberg, M.D., Hamann, D., Schuitemaker, H., and Miedema, F.**, *T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4(+) T cells go out of stock*. Nature Immunology, 2000. 1(4): p. 285-289.
36. **Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M.**, *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. 373(6510): p. 123-6.
37. **Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N.R.**, *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals*. Journal of Experimental Medicine, 1997. 185(4): p. 621-628.
38. **(DAIG), D.A.-G.**, *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion*. 2014. 1.
39. **Günthard, H.F., Saag, M.S., Constance, A.B., del Rio, C., Eron, J.J., Gallant, J.E., Hoy, J.F., Mugavero, M.J., Sax, P.E., Thompson, M.A., Gandhi, R.T., Landovitz, R.J., Smith, D.M., Jacobsen, D.M., and Volberding, P.A.**, *Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults 2016 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel*. 2016.
40. **Maldarelli, F., Palmer, S., King, M.S., Wiegand, A., Polis, M.A., Mican, J., Kovacs, J.A., Davey, R.T., Rock-Kress, D., Dewar, R., Liu, S., Metcalf, J.A., Rehm, C., Brun, S.C., Hanna, G.J., Kempf, D.J., Coffin, J.M., and Mellors, J.W.**, *ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia*. PLoS Pathog, 2007. 3(4): p. e46.
41. **International, A.S.S.W.G.o.H.I.V.C., Deeks, S.G., Autran, B., Berkhout, B., Benkirane, M., Cairns, S., Chomont, N., Chun, T.W., Churchill, M., Di Mascio, M., Katlama, C., Lafeuillade, A., Landay, A., Lederman, M., Lewin, S.R., Maldarelli, F., Margolis, D., Markowitz, M., Martinez-Picado, J., Mullins, J.I., Mellors, J., Moreno, S., O'Doherty, U., Palmer, S., Penicaud, M.C., Peterlin, M., Poli, G., Routy, J.P., Rouzioux, C., Silvestri, G., Stevenson, M., Telenti, A., Van Lint, C., Verdin, E., Woolfrey, A., Zaia, J., and Barre-Sinoussi, F.**, *Towards an HIV cure: a global scientific strategy*. Nat Rev Immunol, 2012. 12(8): p. 607-14.

42. **Pomerantz, R.J.**, *Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication.* Clin Infect Dis, 2002. 34(1): p. 91-7.
43. **Harrigan, P.R., Whaley, M., and Montaner, J.S.G.**, *Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy.* Aids, 1999. 13(8): p. F59-F62.
44. **Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S.**, *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(15): p. 8869-73.
45. **Chun, T.W., Justement, J.S., Moir, S., Hallahan, C.W., Maenza, J., Mullins, J.I., Collier, A.C., Corey, L., and Fauci, A.S.**, *Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus.* J Infect Dis, 2007. 195(12): p. 1762-4.
46. **Zhang, L., Ramratnam, B., Tenner-Racz, K., He, Y., Vesanen, M., Lewin, S., Talal, A., Racz, P., Perelson, A.S., Korber, B.T., Markowitz, M., and Ho, D.D.**, *Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy.* N Engl J Med, 1999. 340(21): p. 1605-13.
47. **Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F.**, *Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells.* Nat Med, 2003. 9(6): p. 727-8.
48. **Hewitt, E.W.**, *The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion.* Immunology, 2003. 110(2): p. 163-9.
49. **Neefjes, J., Jongasma, M.L., Paul, P., and Bakke, O.**, *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.* Nat Rev Immunol, 2011. 11(12): p. 823-36.
50. **Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M.**, *Janeway Immunologie.* 7. Auflage ed. 2009: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
51. **Jiang, S. and Dong, C.**, *A complex issue on CD4(+) T-cell subsets.* Immunol Rev, 2013. 252(1): p. 5-11.
52. **Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B.**, *CD4(+)T cells: differentiation and functions.* Clin Dev Immunol, 2012. 2012: p. 925135.
53. **Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., Hanifin, J.M., and Slifka, M.K.**, *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination.* Nat Med, 2003. 9(9): p. 1131-7.
54. **Appay, V., van Lier, R.A., Sallusto, F., and Roederer, M.**, *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues.* Cytometry A, 2008. 73(11): p. 975-83.
55. **Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M., and Lugli, E.**, *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets.* Eur J Immunol, 2013. 43(11): p. 2797-809.
56. **Jaafoura, S., de Goer de Herve, M.G., Hernandez-Vargas, E.A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M.C., Krzysiek, R., Merad, M., Seng, R., Tardieu, M., Delfraissy,**

- J.F., Goujard, C., and Taoufik, Y.,** *Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells.* Nat Commun, 2014. 5: p. 5407.
57. **Shipkova, M. and Wieland, E.,** *Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation.* Clin Chim Acta, 2012. 413(17-18): p. 1338-49.
58. **Bradley, L.M., Watson, S.R., and Swain, S.L.,** *Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin.* J Exp Med, 1994. 180(6): p. 2401-6.
59. **Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A.,** *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* Nature, 1999. 401(6754): p. 708-12.
60. **Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A.,** *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.* Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 745-63.
61. **Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D.C., Price, D.A., June, C.H., Marincola, F.M., Roederer, M., and Restifo, N.P.,** *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* Nat Med, 2011. 17(10): p. 1290-7.
62. **Fritsch, R.D., Shen, X., Sims, G.P., Hathcock, K.S., Hodes, R.J., and Lipsky, P.E.,** *Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27.* J Immunol, 2005. 175(10): p. 6489-97.
63. **Lugli, E., Goldman, C.K., Perera, L.P., Smedley, J., Pung, R., Yovandich, J.L., Creekmore, S.P., Waldmann, T.A., and Roederer, M.,** *Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in nonhuman primates.* Blood, 2010. 116(17): p. 3238-48.
64. **Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N.,** *Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes.* J Immunol, 2007. 178(7): p. 4112-9.
65. **Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R.F.,** *In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency.* Nat Med, 1995. 1(12): p. 1284-90.
66. **Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S.,** *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(24): p. 13193-7.
67. **Wong, J.K., Hezareh, M., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D.,** *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia.* Science, 1997. 278(5341): p. 1291-5.
68. **Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D., and Siliciano, R.F.,** *Identification of a reservoir for HIV-*

- 1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 1997. 278(5341): p. 1295-300.
69. **Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F.**, *A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications*. *J Antimicrob Chemother*, 2004. 54(1): p. 6-9.
 70. **Donahue, D.A. and Wainberg, M.A.**, *Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency*. *Retrovirology*, 2013. 10: p. 11.
 71. **Williams, S.A. and Greene, W.C.**, *Host factors regulating post-integration latency of HIV*. *Trends Microbiol*, 2005. 13(4): p. 137-9.
 72. **Ostrowski, M.A., Chun, T.W., Justement, S.J., Motola, I., Spinelli, M.A., Adelsberger, J., Ehler, L.A., Mizell, S.B., Hallahan, C.W., and Fauci, A.S.**, *Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. *J Virol*, 1999. 73(8): p. 6430-5.
 73. **Malnati, M.S., Scarlatti, G., Gatto, F., Salvatori, F., Cassina, G., Rutigliano, T., Volpi, R., and Lusso, P.**, *A universal real-time PCR assay for the quantification of group-M HIV-1 proviral load*. *Nat Protoc*, 2008. 3(7): p. 1240-8.
 74. **Palmer, S., Wiegand, A.P., Maldarelli, F., Bazmi, H., Mican, J.M., Polis, M., Dewar, R.L., Planta, A., Liu, S., Metcalf, J.A., Mellors, J.W., and Coffin, J.M.**, *New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma*. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(10): p. 4531-6.
 75. **Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.**, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. 239(4839): p. 487-91.
 76. **Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K.**, *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. *PCR Methods Appl*, 1995. 4(6): p. 357-62.
 77. **Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., and Colston, B.W.**, *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. *Anal Chem*, 2011. 83(22): p. 8604-10.
 78. **Behrendt, R., Fiebig, U., Norley, S., Gurtler, L., Kurth, R., and Denner, J.**, *A neutralization assay for HIV-2 based on measurement of provirus integration by duplex real-time PCR*. *J Virol Methods*, 2009. 159(1): p. 40-6.
 79. **Kobbe, G., Kaiser, R., Knops, E., Lübke, N., Dunay, G., Fischer, J., Hüttig, F., Haas, R., Häussinger, D., and Jensen, B.**, *Treatment of HIV and acute myeloid leukemia by allogeneic CCR5-d32 blood stem cell transplantation*. *Proceedings of the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, 2016.

80. **Gaillard, C. and Strauss, F.**, *Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments*. Technical Tips Online, 1998. 3: p. 63 - 65.
81. **Schmid, I., Lambert, C., Ambrozak, D., and Perfetto, S.P.**, *Standard safety practices for sorting of unfixed cells*. Curr Protoc Cytom, 2007. Chapter 3: p. Unit3 6.
82. **Howat, W.J. and Wilson, B.A.**, *Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures*. Methods, 2014. 70(1): p. 12-9.
83. **Srinivasan, M., Sedmak, D., and Jewell, S.**, *Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids*. Am J Pathol, 2002. 161(6): p. 1961-71.
84. **Russell, J.N., Clements, J.E., and Gama, L.**, *Quantitation of gene expression in formaldehyde-fixed and fluorescence-activated sorted cells*. PLoS One, 2013. 8(9): p. e73849.
85. **Clouse, K.A., Powell, D., Washington, I., Poli, G., Strebel, K., Farrar, W., Barstad, P., Kovacs, J., Fauci, A.S., and Folks, T.M.**, *Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone*. J Immunol, 1989. 142(2): p. 431-8.
86. **Desire, N., Dehee, A., Schneider, V., Jacomet, C., Goujon, C., Girard, P.M., Rozenbaum, W., and Nicolas, J.C.**, *Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay*. J Clin Microbiol, 2001. 39(4): p. 1303-10.
87. **Ometto, L., De Forni, D., Patiri, F., Trouplin, V., Mammano, F., Giacomet, V., Giaquinto, C., Douek, D., Koup, R., and De Rossi, A.**, *Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness*. Aids, 2002. 16(6): p. 839-849.
88. **Mexas, A.M., Graf, E.H., Pace, M.J., Yu, J.J., Papasavvas, E., Azzoni, L., Busch, M.P., Di Mascio, M., Foulkes, A.S., Migueles, S.A., Montaner, L.J., and O'Doherty, U.**, *Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials*. AIDS, 2012. 26(18): p. 2295-306.
89. **Brussel, A., Delelis, O., and Sonigo, P.**, *Alu-LTR real-time nested PCR assay for quantifying integrated HIV-1 DNA*. Methods Mol Biol, 2005. 304: p. 139-54.
90. **De Spiegelaere, W., Malatinkova, E., Lynch, L., Van Nieuwerburgh, F., Messiaen, P., O'Doherty, U., and Vandekerckhove, L.**, *Quantification of integrated HIV DNA by repetitive-sampling Alu-HIV PCR on the basis of poisson statistics*. Clin Chem, 2014. 60(6): p. 886-95.
91. **Liszewski, M.K., Yu, J.J., and O'Doherty, U.**, *Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR*. Methods, 2009. 47(4): p. 254-60.
92. **Eriksson, S., Graf, E.H., Dahl, V., Strain, M.C., Yukl, S.A., Lysenko, E.S., Bosch, R.J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F., Abdel-Mohsen, M., Hoh, R., Hecht, F., Hunt, P., Somsouk, M., Wong, J., Johnston, R., Siliciano, R.F., Richman, D.D., O'Doherty, U., Palmer, S., Deeks, S.G., and Siliciano, J.D.**, *Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies*. PLoS Pathog, 2013. 9(2): p. e1003174.

93. **Sanchez, G., Xu, X., Chermann, J.C., and Hirsch, I.,** *Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals.* J Virol, 1997. 71(3): p. 2233-40.
94. **Kieffer, T.L., Kwon, P., Nettles, R.E., Han, Y., Ray, S.C., and Siliciano, R.F.,** *G-->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo.* J Virol, 2005. 79(3): p. 1975-80.
95. **Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F.,** *Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals.* Methods Mol Biol, 2005. 304: p. 3-15.
96. **Laird, G.M., Eisele, E.E., Rabi, S.A., Lai, J., Chioma, S., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F.,** *Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay.* PLoS Pathog, 2013. 9(5): p. e1003398.
97. **Pasternak, A.O., Adema, K.W., Bakker, M., Jurriaans, S., Berkhout, B., Cornelissen, M., and Lukashov, V.V.,** *Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA.* J Clin Microbiol, 2008. 46(7): p. 2206-11.
98. **Vandergeeten, C., Fromentin, R., Merlini, E., Lawani, M.B., DaFonseca, S., Bakeman, W., McNulty, A., Ramgopal, M., Michael, N., Kim, J.H., Ananworanich, J., and Chomont, N.,** *Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies.* J Virol, 2014. 88(21): p. 12385-96.
99. **Smith, K.A.,** *Interleukin-2: inception, impact, and implications.* Science, 1988. 240(4856): p. 1169-76.
100. **Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., and Mackay, C.R.,** *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): p. 1925-30.
101. **Holl, V., Schmidt, S., Aubertin, A.M., and Moog, C.,** *The major population of PHA-stimulated PBMC infected by R5 or X4 HIV variants after a single cycle of infection is predominantly composed of CD45RO+CD4+ T lymphocytes.* Arch Virol, 2007. 152(3): p. 507-18.
102. **Tabler, C.O., Lucera, M.B., Haqqani, A.A., McDonald, D.J., Migueles, S.A., Connors, M., and Tilton, J.C.,** *CD4+ memory stem cells are infected by HIV-1 in a manner regulated in part by SAMHD1 expression.* J Virol, 2014. 88(9): p. 4976-86.
103. **Ostrowski, M.A., Chun, T.W., Justement, S.J., Motola, I., Spinelli, M.A., Adelsberger, J., Ehler, L.A., Mizell, S.B., Hallahan, C.W., and Fauci, A.S.,** *Both memory and CD45RA(+)/CD62L(+) naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals.* Journal of Virology, 1999. 73(8): p. 6430-6435.
104. **Cayota, A., Vuillier, F., Scott-Algara, D., Feuille, V., and Dighiero, G.,** *Differential requirements for HIV-1 replication in naive and memory CD4 T cells from asymptomatic HIV-1 seropositive carriers and AIDS patients.* Clin Exp Immunol, 1993. 91(2): p. 241-8.

105. **Schnittman, S.M., Lane, H.C., Greenhouse, J., Justement, J.S., Baseler, M., and Fauci, A.S.,** *Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(16): p. 6058-62.
106. **Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Hill, B.J., Douek, D.C., Routy, J.P., Haddad, E.K., and Sekaly, R.P.,** *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation.* Nat Med, 2009. 15(8): p. 893-900.
107. **Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., Pereyra, F., Zurakowski, R., Walker, B.D., Rosenberg, E.S., Yu, X.G., and Lichterfeld, M.,** *HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties.* Nat Med, 2014. 20(2): p. 139-42.
108. **Kabamba-Mukadi, B., Henrivaux, P., Ruelle, J., Delferriere, N., Bodeus, M., and Goubau, P.,** *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler real-time PCR.* BMC Infect Dis, 2005. 5: p. 15.
109. **Buzon, M.J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J.Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N., Martinez-Picado, J., Zurakowski, R., Yu, X.G., Telenti, A., Walker, B.D., Rosenberg, E.S., and Lichterfeld, M.,** *Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells.* J Virol, 2014. 88(17): p. 10056-65.
110. **Archin, N.M., Vaidya, N.K., Kuruc, J.D., Liberty, A.L., Wiegand, A., Kearney, M.F., Cohen, M.S., Coffin, J.M., Bosch, R.J., Gay, C.L., Eron, J.J., Margolis, D.M., and Perelson, A.S.,** *Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4(+) cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. 109(24): p. 9523-9528.
111. **Josefsson, L., von Stockenstrom, S., Faria, N.R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Tan, A., Ho, T., Lemey, P., Shao, W., Hunt, P.W., Somsouk, M., Wylie, W., Douek, D.C., Loeb, L., Custer, J., Hoh, R., Poole, L., Deeks, S.G., Hecht, F., and Palmer, S.,** *The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(51): p. E4987-96.
112. **Wagner, T.A., McKernan, J.L., Tobin, N.H., Tapia, K.A., Mullins, J.I., and Frenkel, L.M.,** *An Increasing Proportion of Monotypic HIV-1 DNA Sequences during Antiretroviral Treatment Suggests Proliferation of HIV-Infected Cells.* Journal of Virology, 2013. 87(3): p. 1770-1778.
113. **von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Shao, W., Hoh, R., Ho, T., Faria, N.R., Lemey, P., Albert, J., Hunt, P., Loeb, L., Pilcher, C., Poole, L., Hatano, H., Somsouk, M., Douek, D., Boritz, E., Deeks, S.G., Hecht, F.M., and Palmer, S.,** *Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy.* Journal of Infectious Diseases, 2015. 212(4): p. 596-607.

114. **Bosman, K.J., Nijhuis, M., van Ham, P.M., Wensing, A.M., Vervisch, K., Vandekerckhove, L., and De Spiegelaere, W.,** *Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir.* Sci Rep, 2015. 5: p. 13811.
115. **Kiselinova, M., Pasternak, A.O., De Spiegelaere, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., and Vandekerckhove, L.,** *Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA.* PLoS One, 2014. 9(1): p. e85999.
116. **Strain, M.C., Lada, S.M., Luong, T., Rought, S.E., Gianella, S., Terry, V.H., Spina, C.A., Woelk, C.H., and Richman, D.D.,** *Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR.* PLoS One, 2013. 8(4): p. e55943.
117. **Ruelle, J., Yfantis, V., Duquenne, A., and Goubau, P.,** *Validation of an ultrasensitive digital droplet PCR assay for HIV-2 plasma RNA quantification.* J Int AIDS Soc, 2014. 17(4 Suppl 3): p. 19675.
118. **Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L., and Tewari, M.,** *Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR.* Nat Methods, 2013. 10(10): p. 1003-5.
119. **Dong, L., Meng, Y., Sui, Z., Wang, J., Wu, L., and Fu, B.,** *Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material.* Sci Rep, 2015. 5: p. 13174.
120. **Kiselinova, M., De Spiegelaere, W., Buzon, M.J., Malatinkova, E., Lichterfeld, M., and Vandekerckhove, L.,** *Correction: Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth.* PLoS Pathog, 2016. 12(3): p. e1005532.
121. **Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S., and Emslie, K.R.,** *Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification.* Anal Chem, 2012. 84(2): p. 1003-11.
122. **Henrich, T.J., Gallien, S., Li, J.Z., Pereyra, F., and Kuritzkes, D.R.,** *Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR.* J Virol Methods, 2012. 186(1-2): p. 68-72.
123. **Jones, M., Williams, J., Gartner, K., Phillips, R., Hurst, J., and Frater, J.,** *Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, 'definetherain'.* J Virol Methods, 2014. 202: p. 46-53.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinen Dank an Dr. Norbert Bannert aussprechen, für seine Gutachtertätigkeit und für die Möglichkeit meine Arbeit am RKI anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt Dr. Steve Norley für die Ausgabe des Themas dieser Arbeit, für die Beantwortung jeglicher Fragen und für die Hilfe bei der FACS Analyse. Außerdem möchte ich Dr. Oliver Hohn danken, der immer bereit war, mir bei jeder noch so kleinen Frage zu helfen und mir sehr viele praktische Dinge im Labor beigebracht hat.

Darüber hinaus möchte ich allen Menschen des FG18 für eine sehr schöne Zeit am RKI danken.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für seine Gutachtertätigkeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die Arbeit von mir selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet und sämtliche Stellen der Arbeit, die anderen benutzten Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem einzelnen Falle unter Angabe des Ursprungs als Entlehnung kenntlich gemacht wurden.

Berlin, der

Vanessa Lamm