

**Untersuchung von HIV-1 Subtypen und
rekombinanten Formen (CRFs)
in HIV-infizierten Patienten aus dem Oman**

Bachelorarbeit

im Bachelor-Studiengang Biotechnologie/

Biotechnology

der Beuth Hochschule für Technik

- University of Applied Sciences –

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Bachelor of Science (B. Sc.)

vorgelegt von

Christiane Anika Bresk

September 2012

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ART	Antiretrovirale Therapie
CRF	Circulating recombinant forms
DDE	D64, D116, E152
ENV	Envelope
FCV	Felines Calicivirus
GAG	Gruppenspezifische Antigene
HET	Heterosexuelle Kontakte
HHCC	Histidin-Histidin-Cystein-Cystein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IDU	Intravenöse Drogennutzer (injecting drug users)
INT	Integrase
LTR	Long terminal repeats
MSM	Men who have sex with men
NEF	Negative factor
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase- Inhibitor
NNRTI	Nicht- Nukleosidische Reverse-Transkriptase- Inhibitor
PI	Protease-Inhibitor
POL	Polymerase
PPI	Postpartale Infektion
PR/RT	Protease-Reverse Transkriptase
REF	Regulator of virion expression

TAT	Transactivator of transcription
URF	Unique recombinant forms
VIF	Virion infectivity factor
VPR	Viral protein R
VPU	Viral protein U

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemein.....	1
1.2	Klassifizierung von HIV-1.....	1
1.3	Morphologie und Genom von HIV-1	2
1.4	HIV im Oman	3
1.5	Ziel.....	4
2	Material und Methoden	5
2.1	Material.....	5
2.1.1	Technische Geräte	5
2.1.2	Enzyme.....	5
2.1.3	Chemikalien	5
2.1.4	Kommerzielle Kits	6
2.1.5	Referenzen	6
2.1.6	Patientenproben	7
2.1.7	Primer	7
2.1.8	Software	7
2.2	Methoden.....	8
2.2.1	RNA-Extraktion	8
2.2.2	Int-916-RT-PCR.....	9
2.2.3	Gelelektrophorese zur Qualifizierung und Quantifizierung von DNA ...	10
2.2.4	Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel.....	11
2.2.5	Aufreinigung von DNA	11
2.2.6	Cycler-DNA-Sequenzierung-PCR.....	11
2.2.7	Phylogenetische Analysen.....	13
3	Ergebnisse	16
3.1	Studienpanel: HIV-1 Patienten Proben aus dem Oman.....	16

3.2	Subtyp-generische Amplifikation der Integrase von HIV-1.....	17
3.3	Genotypische Klassifizierung der Integrase von HIV-1.....	18
3.4	Vergleichende phylogenetische Analyse der PR/RT-Region, der INT-Region und der PR/RT/INT-Region von HIV-1 aus dem Oman	22
4	Diskussion	27
4.1	Verwendung einer subtyp-generischen RT-PCR zur Amplifikation der Integrase von HIV-1 Isolaten aus dem Oman	27
4.2	Genetische Klassifikation der Integrase von HIV-1 aus dem Oman	28
4.3	Klassifizierung der Genregionen <i>pr/rt</i> und <i>int</i>	28
4.4	Analyse der Mosaikstruktur im <i>pol</i> -Gen von HIV-1 Isolaten aus dem Oman	29
4.5	Ausblick	30
5	Zusammenfassung.....	31
6	Summary	32
7	Literaturverzeichnis	33
8	Eidesstattliche Erklärung	36
9	Danksagung.....	37
10	Appendix	38

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Im Jahre 1981 wurde in den USA zunehmend eine bis dahin unbekannte erworbene Immundefizienz, die mit schwerwiegenden opportunistischen Infektionen einherging, diagnostiziert.¹⁻⁷ Kurze Zeit später wurde das **Humane Immundefizienz Virus (HIV)** als infektiöses Agens dieser erworbenen Immunschwäche **AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)** identifiziert.^{8,9} Seit 1983 haben sich ca. 60 Millionen Menschen mit HIV infiziert und 25 Millionen sind an AIDS gestorben.^{6,10-13} Derzeit leben ca. 34 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion, davon lebt der Großteil in Afrika (22,9 Millionen).¹⁴ Das Virus wird durch infektiöse Körperflüssigkeiten (Sperma, Vaginalsekret, Blut und Muttermilch) übertragen. AIDS ist eine chronische Infektion, die aus dem Körper nicht zu eliminieren ist. Durch die antiretrovirale Therapie (ART) ist es möglich die Replikation des Virus zu vermindern, die Ausbreitung im Körper einzudämmen und die Krankheitsprogression zu verlangsamen. Derzeit werden Präparate fünf unterschiedlicher Wirkstoffklassen in der ART eingesetzt: Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Protease-Inhibitoren (PIs), Fusions-Inhibitoren und Integrase-Inhibitoren.¹⁵

1.2 Klassifizierung von HIV-1

Der Ursprung des Virus ist bei den nicht-menschlichen Primaten zu finden. Durch multiple Zoonosen ist das **SIV (Simian Immunodeficiency Virus)** vom Affen auf den Menschen übergegangen. Durch Übertragung des Virus von der Rußmangabe auf den Menschen entstand HIV-2, durch unabhängige Transmissionsereignisse von großen Menschenaffen auf den Menschen ist HIV-1 entstanden, das auf der Grundlage von phylogenetischen Analysen derzeit in vier Gruppen eingeteilt wird.^{1,11,16,17} Diese werden als M (major), N (non-M, non-O), O (outlier) und P (pending the identification of further human cases) bezeichnet. Die Pandemie wird von Infektionen mit HIV-1 der Gruppe M dominiert. Durch die Übertragung von Mensch zu Mensch sind unterschied-

liche Subtypen entstanden, die nicht serologisch, aber genetisch voneinander zu unterscheiden sind. Derzeit wird die Gruppe M in neun Subtypen und 54 CRFs (**Circulating Recombinant Forms**) unterteilt.^{1,11,14,18-23}

Wird ein Individuum mehrfach von genetisch unterschiedlichen Viren infiziert entstehen rekombinante Formen. Diese Formen werden in CRF und **Unique Recombinant Forms (URF)** eingeteilt.¹¹ Um als neuer Subtyp oder rekombinante Form charakterisiert zu werden, muss diese in mindestens drei epidemiologisch voneinander unabhängigen Individuen auftreten, zwei der Isolate müssen über die gesamte Genomlänge charakterisiert sein und die genetische Distanz zu bekannten Isolaten muss signifikant sein.^{11,24}

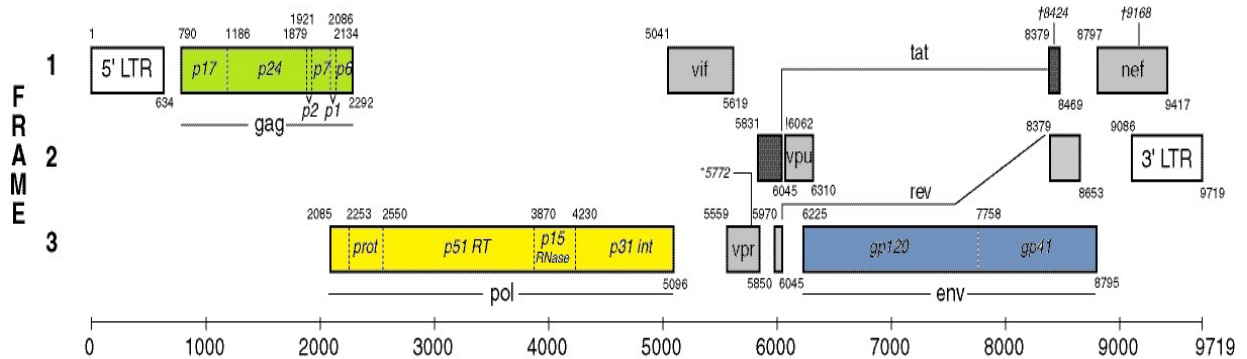
1.3 Morphologie und Genom von HIV-1

Die HIV-Partikel sind von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs umhüllt. Darin befinden sich eine Vielzahl von Enzymen und Strukturproteinen. Im Inneren des konischen Kapsids ist das Genom des Retrovirus in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Kopien lokalisiert. Das Genom besteht aus drei großen offenen Leserahmen, die die Strukturproteine *gag* (gruppenspezifische Antigene), *env* (Hüllglykoproteine) und die *pol*-Enzyme (Polymerasefunktion) kodieren. Diese sind gemeinsam mit Genen für zwei regulatorische Proteine (*tat* und *ref*) und Genen für vier akzessorische Proteine (*vpr*, *vpu*, *vif* und *nef*) im 9749 Bp²⁵ großen Genom überlappend angeordnet (Abb. 1). Flankiert wird das Genom von zwei nicht kodierenden LTR-Regionen, wobei die 5'-LTR die Promotorfunktion für die Expression der viralen Gene ausübt.^{6,26,27}

Die *pol*-Region (Abb. 1) erstreckt sich von den Basen 2253 – 5096 (HxB2, Acc. No. 03455) und beinhaltet die Geninformation für folgende Replikationsproteine: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), Ribonuklease H und Integrase (INT).²⁶ Die RT schreibt die virale genomische RNA in cDNA um. Der Einbau der DNA erfolgt durch das Enzym Integrase. Diese entfernt ein Dinukleotid an beiden 3' Enden, sodass diese anschließend in das Wirtsgenom eingebaut werden können (Strangtransfer). Während die Integrase wirksam ist, wird die RNA parallel durch die Ribonuklease H degradiert. Die Protease hat die Aufgabe, nachdem sie sich autokatalytisch aus dem Gag-Vorläuferprotein abgespalten hat, die Gag- und Pol-Vorläufer-Polypoteine in funktio-

nale Proteine zu prozessieren. Erst durch diesen Maturationsprozess werden die Viren infektios.²⁷⁻³²

A)



B)

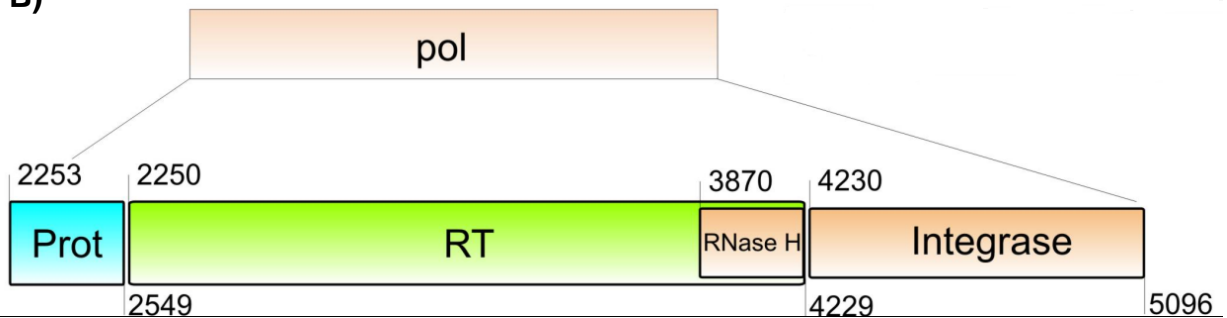


Abbildung 1 Genom von HIV

A) Genom von HIV (Quelle³³ bearbeitet) Offene Leserahmen (Frames) sind als Rechtecke dargestellt. Der Start eines Gens wird durch die kleine Nummer, welche das A des ATG markiert, an den oberen linken Ecken angezeigt und durch die Nummer (letzte Position des Stopp-Codons) an den unteren rechten Ecken beendet.

B) Vergrößerter Ausschnitt der *pol*-Region mit den einzelnen Genregionen Protease, Reverse Transkriptase, RNase H und Integrase

1.4 HIV im Oman

2011 entstand die Zusammenarbeit zwischen dem Ministry of Health, Central Public Laboratories, in Muscat, Sultanat Oman und dem Robert Koch-Institut in Berlin, Deutschland. Ziel der Zusammenarbeit sind Untersuchungen zur Resistenz und molekularen Epidemiologie von HIV im Oman. Im Vordergrund steht dabei zum einen die genotypische Resistenzanalyse bei therapierten und therapie-naiven HIV-Patienten. Ein zweiter Schwerpunkt ist die phylogenetische Klassifizierung der im Oman zirkulierenden HIV-1 Subtypen und rekombinanten Formen (CRFs). Nach offiziellen Angaben leben derzeit 1371 HIV-infizierte Menschen im Oman.³⁴ Bisher

gibt es keine Daten zur genetischen Diversität der Subtypen und der zirkulierenden rekombinanten Formen (CRFs).

1.5 Ziel

Die hohe Mutationsrate und die fehlende *Proof-reading*-Funktion der Reversen Transkriptase führen bei HIV zu einer hohen genetischen Diversität.⁶ Die einzelnen genetischen Varianten von HIV-1 können nicht serologisch voneinander unterschieden werden, sondern werden anhand von phylogenetischen Analysen auf Grundlage ihrer Nukleotidsequenz klassifiziert. In einer Vielzahl von Studien gibt es auch Hinweise auf mögliche Unterschiede der biologischen Eigenschaften der Subtypen und rekombinanten Formen. Diese Eigenschaften können u.a. Einfluss auf die unterschiedliche Ausbreitung, auf die Krankheitsprogression und auf die Sicherheit der Diagnostik haben.

35-37

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Klassifizierung von epidemisch relevanten HIV-1 Varianten im Oman. Die erzielten Ergebnisse sollen einen Beitrag zu Untersuchungen der molekularen Epidemiologie von HIV-1 im Oman leisten.

Diese Arbeit schließt u. a. an dem vorangegangenen Praxisbericht (Juni, 2012) an. In diesem wurden Proben von HIV-1-infizierten Patienten aus dem Oman anhand der Protease- und Reversen Transkriptase-Sequenz (PR/RT) klassifiziert. Dabei wurde ein hoher Anteil von rekombinanten Viren identifiziert, die sich von bislang bekannten HIV-Varianten genetisch unterscheiden. Zur Klassifizierung der HIV-Isolate aus dem Oman wird in dieser Bachelorarbeit die Integrase-Region (INT) untersucht. Die Analyse dieser Region trägt somit zur genauen Untersuchung der Mosaikstrukturen bislang unbekannter, nahezu vollständigen POL-Sequenzen bei.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Zentrifuge	Mikrozentrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg Heraeus Pico 17, Thermo Scientific, USA
Thermoblock	TS-100 Thermoblock, Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Zykler	Mastercycler proS, Eppendorf AG, Hamburg GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Californien, USA T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen MX3000P, Stratagene, Californien, USA
Gelelektrophoresekammer	Horizon 58, Invitrogen, Karlsruhe
Videodokumentationssystem	
E.A.S.Y RH-3	Herolab GmbH, Wiesloch

2.1.2 Enzyme

RNasin	RNase-Inhibitor, Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase (SSII)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien

96% Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Amresco, Solon, OH, USA
Gene Ruler™ 1kB DNA-Ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Low Mass Ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
6x Loading Buffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
99%-100% CH ₃ COOH	MERCK KGaA, Darmstadt
EDTA 0,5 M pH 8,0	MERCK KGaA, Darmstadt

2.1.4 Kommerzielle Kits

QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
MSB Spin PCRapace	Invitex, Berlin
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Penzberg
BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.5 Referenzen

Positivkontrolle	HIV-Laborstamm HTLV _{III} B (1x10 ⁴ Kopien/mL) aus Virusstock in H-9 Zellen vermehrt; Tag der Abnahme: Tag 21
Negativkontrolle	HIV-negatives Plasma, Pool aus 26 Einzelspenden, Paul-Ehrlich-Institut

Referenzpanel für die

Phylogenetischen Analysen

Subtypreferenzpanel der Los Alamos Datenbank 2010 (n=170)

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>

FCV

Felines Calicivirus, Fachgebiet 15, Robert Koch-Institut

2.1.6 Patientenproben

Für vorliegende Untersuchungen standen Plasmaproben von 84 HIV-1 positiven Patienten aus zehn medizinischen Einrichtungen aus dem Oman zur Verfügung. Für den Transport dieser Proben existiert ein positives Ethikvotum aus dem Oman.

2.1.7 Primer

Int-PCR (916 bp)	Sequenz 5'-3'	Koordinaten*
5'-INT	5'- ATT GGA GGA AAT GAA CAA GT -3'	4173 – 4192
3p31as	5'- ATC CTG TCT ACY TGC CAC ACA A -3'	5066 – 5087
Int-Sequenzierung		
5'-INT	5'- ATT GGA GGA AAT GAA CAA GT -3'	4173 – 4192
3p31as	5'- ATC CTG TCT ACY TGC CAC ACA A -3'	5066 – 5087
F2s	5'- TAA GAC AGC AGT ACA AAT GGC AG -3'	4745 – 4767
F3as	5'- GCT GTC CCT GTA ATA AAC CCG -3'	4899 – 4919

* Isolat HxB2 AccNo. #K03455 der HIV-Datenbank (http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/asearch/query_one.comp?se_id=K03455)

2.1.8 Software

DNASTAR-Lasergene SeqMan Pro,

Version 10.0.1

DNASTAR, Madison, Winconsin, USA

EASY Win32-System

Herolab GmbH, Wiesloch

Stanford Webtool	http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra
REGA HIV Subtyping Tool Version 2.0	http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/
Los Alamos HIV-Datenbank	http://www.hiv.lanl.gov/content/index
BLAST-Search	http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html
BioEdit Version 7.0.9	Tom Hall, Sequence Alignment Editor ³⁸
PHYLIPP package 3.69	Joe Felsenstein
CorelDRAW Graphics Suite 12	Corel Corporation 2010

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion viraler RNA wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen benutzt. Als Positivkontrolle diente der Laborstamm HTLV_{III B} (1×10^4 Kopien/mL) und HIV-negatives Plasma als Negativkontrolle.

Zur Entfernung von Kryopräzipitaten wurden 500 μ L des Plasmas bei $3.000 \times g$ 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme von 450 μ L Überstand und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß wurden die Viren durch Zentrifugation bei $20.800 \times g$ für weitere 90 Minuten (bei 4 °C) pelletiert. Anschließend wurden 315 μ L Überstand entnommen, verworfen und 5 μ L FCV (interner Standard) hinzu pipettiert, um bei Bedarf eine Viruslastbestimmung durchzuführen. Zu dem verbleibenden Viruspellet mit 140 μ L Überstand wurde 560 μ L AVL-Lysepuffer mit t-RNA hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 560 μ L 99,8 % Ethanol (4 °C). Die Proben wurden anschließend auf die Mikrosäule aufgegeben. Die folgenden Schritte wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die RNA wurde in 60 μ L AVE-Puffer eluiert, in Aliquots zu je 10 μ L portioniert und mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die RNA wird bei -70 °C für max. sechs Monate gelagert.

Während der RNA-Extraktion wurde auf eine DNase-Behandlung verzichtet, da bei der üblichen genotypischen Resistenztestung eine DNase-Behandlung nicht vorgesehen ist.

2.2.2 *Int-916-RT-PCR*

Bei der *Int-916-RT-PCR* handelt es sich um eine inhouse-PCR mit subtyp-generischen Primern (Dr. Rolf Kaiser, Virologisches Institut der Universität Köln), die am RKI etabliert wurde³⁹.

Ein Aliquot aus der RNA-Extraktion wurde bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurden 10 µL der Probe mit 40 µL des entsprechenden Mastermixes versetzt und nach der Reversen Transkription (50 °C 30 min, 95 °C 15 min) bei folgendem Cyclerprogramm amplifiziert. Dieses enthält einen „touchdown“-Zyklus bei dem die Temperatur in den ersten beiden Zyklen um je 5 °C gesenkt wird.

Mastermix:

Reagenz	Konz. Stock	Konz. final
H ₂ O	-	23 µL/Ansatz
5x Puffer (12.5 mM MgCl ₂)	5x	1x
dNTP Mix	10 µM	400 µM (pro dNTP)
as-Primer 3p31	25 µM	0,5 µM
s-Primer 5'-INT	25 µM	0,5 µM
RNasin	40 U/µl	40 U
Enzym Mix	-	2µL/Ansatz

Cyclerprogramm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	30 s	
65°C touchdown 2x -5 °C	45 s	2x
72°C	3 min	
95°C	30 s	
55°C	45 s	43x
72°C	3 min	
72°C	10 min	1x
4°C		∞

2.2.3 Gelelektrophorese zur Qualifizierung und Quantifizierung von DNA

Die Produkte der *int*-PCR (916 bp) wurden mittels qualitativer Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid (0,4 µg/mL) gefärbtem Agarosegel dargestellt.

Das portionierte 1 % Agarosegel (25 mL) wurde in einer Mikrowelle aufgelöst, in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen und vor der Polymerisierung, mit einem bzw. zwei Kämmen versehen. Die Größe des PCR-Produktes wurde mit Hilfe des mitgeführten Größenstandards (Gene Ruler™ 1kB DNA-Ladder, 100 ng/µL) ermittelt.

3µL der PCR-Ansätze wurden mit 3 µL H₂O und 1 µL 6x Loading Dye versetzt. Davon wurden 5 µL auf das Gel aufgetragen. Für das qualitative Gel wurden 3 µL des Größenstandards aufgetragen. Nach der Produktaufreinigung (Methode 2.2.5) wurde für das quantitative Gel 2 µL Probe mit 2 µL H₂O und 1 µL 6x Loading Dye versetzt und anschließend der gesamte Ansatz auf das Gel aufgetragen. Als Konzentrations- und Größenstandard wurde der Low Mass Ladder, welche wie die Probe behandelt wurde, eingesetzt. Nach Auftrennung der PCR-Fragmente für 30 Minuten bei 90 Volt wurde die DNA anhand einer Eichkurve des Konzentrationsstandards quantifiziert. Die Auswertung der qualitativen als auch der quantitativen Gele erfolgte mit dem System E.A.S.Y RH-3 und der dazugehörigen Software EASY Win32-System.

2.2.4 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel

Diese Methode wird angewandt, um definierte DNA-Fragmente aus einem Gemisch unterschiedlich großer Fragmente zu isolieren und aufzureinigen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente (45 µL DNA+7,5 µL Ladepuffer) wurde das Zielfragment (Integrase 916 bp) unter UV-Bestrahlung ausgeschnitten, gewogen und nach dem Protokoll „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Die eluierte RNA (50 µL) wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte nach dem qualitativen Gel mit dem restlichen Volumen (47 µL) der PCR-Reaktion.

Die Aufreinigung wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit 50 µL Elutionspuffer in einem neuen Gefäß eluiert. Durchschnittlich wurden DNA-Konzentration von 10,0 ng/µL – 77,0 ng/µL erhalten. Die aufgereinigte DNA wurde mittels Gelelektrophorese quantifiziert und bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Cyclor-DNA-Sequenzierung-PCR

Zur Sequenzierung der Produkte wurde das Kettenabbruchverfahren nach Sanger angewendet. Für die Sequenzierung der *int*-PCR-Produkte wurden vier sequenzspezifische Primer (2.1.7) verwendet (Abb. 2).

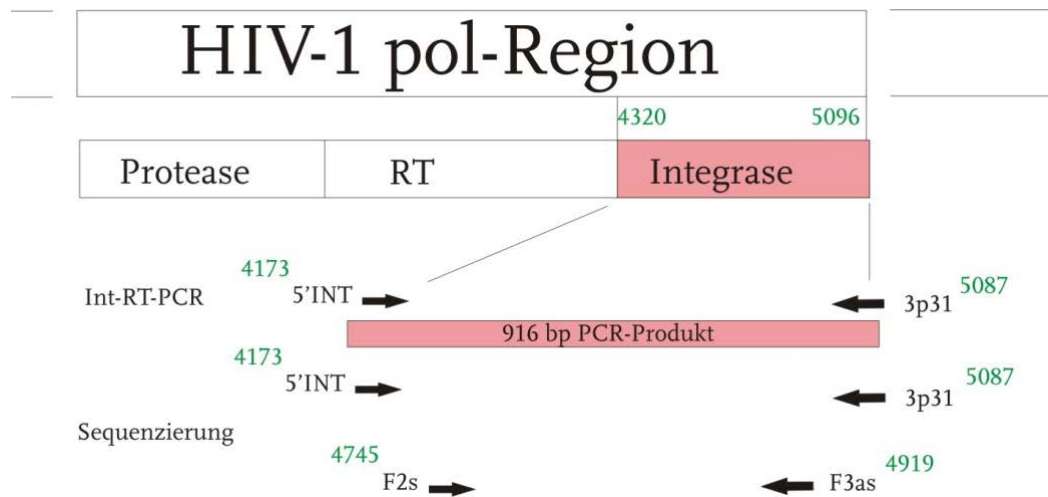


Abbildung 2 Übersicht der Primer zur RT-PCR der *int*-Region sowie zur Sequenzierung

HIV-1 *pol*-Region mit den einzelnen Genabschnitten, darunter verwendete Primer zur Amplifikation der Integrase (916 bp); eingesetzte Sequenzierungsprimer mit Lokalisation entsprechend HxB2 (Acc. No. K03455)

Die quantifizierten PCR-Produkte wurden auf 10 ng/μL eingestellt und 2 μL der Probe wurden mit 8 μL eines Mixes aus H₂O, Primer, Puffer und BigDye 3.1 versetzt.

Reagenz	Volumen /Ansatz
Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl
BigDye 3.1	2,0 μl
5 x Puffer (4°C)	1,0 μl
H ₂ O	4,5 μl
Probe	2,0 μL

Die Ansätze durchliefen anschließend folgendes Cyclerprogramm:

Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
96	2 min	1
96	10 s	
50	5 s	25
60	4 min	
4	∞	

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben vom hauseigenen Sequenzierungsservice über Gelfiltration aufgereinigt und mittels Polyacryl-Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die mit dem Programm Sequence Analysis Program (ABI) analysierten Sequenzdaten wurden dem User wieder zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Program DNASTAR Lasergene SeqMan Pro Version 10.0.1. Es wurde eine Konsensus-Sequenz aus vier Einzelsequenzen in Form eines fasta-Formates erzeugt und für weitere Anwendungen exportiert.

2.2.7 Phylogenetische Analysen

Mit Hilfe der Phylogenie (Stammesgeschichte) lassen sich Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Populationen oder Individuen, bei denen man einen gemeinsamen Vorfahren vermutet, feststellen. Geschieht dies mit Hilfe von molekularen Merkmalen (z. B. DNA-Sequenzen, Protein-Sequenzen etc.), bezeichnet man es als molekulare Phylogenie. Anhand phylogenetischer Analysen der *pr/rt*- und der *int*-Region kann der Subtyp der HIV-Isolate bestimmt werden.^{40,41}

Zunächst erfolgt die Alignierung der eingeladenen Sequenzen (fasta-Format) mit Hilfe der Software ClustalW (BioEdit). Alle im Alignment enthaltenen Sequenzen werden anschließend auf die gleiche Länge editiert. PHYLIP erstellt über das Tool Dnadist (Kimura 2-Parameter) eine Distanzmatrix, in der alle Positionen im Alignment paarweise verglichen werden. Basierend auf den Distanzen in dieser Matrix wird mit der Neighbor-Joining-Methode die Verwandtschaft von Sequenzen in einer phylogenetischen Baumstruktur errechnet. Die Knoten repräsentieren den letzten gemeinsamen Vorfahren von zwei sich voneinander abspaltendem Sequenzen (Abb. 3). Die Äste entsprechen der Anzahl von Mutationen, die sich im Verlauf dieser Auftrennung ereignet haben. Die Darstellung des Baumes als Phylogramm liefert, im Gegensatz zum Kladogramm, ein Größenmaß für die Anzahl von Mutationen über die Astlänge, d.h. je länger ein Ast, desto mehr Mutationereignisse haben stattgefunden.

Bei einem Stammbaum sind die horizontalen Astlängen proportional zu dem Unterschied zwischen zwei Isolaten. Der Skalenwert von 0,1 steht für den Austausch von 0,1 Nukleotiden pro Position im Alignment, was 10 % Unterschied in der Basenpaarabfolge bedeutet.

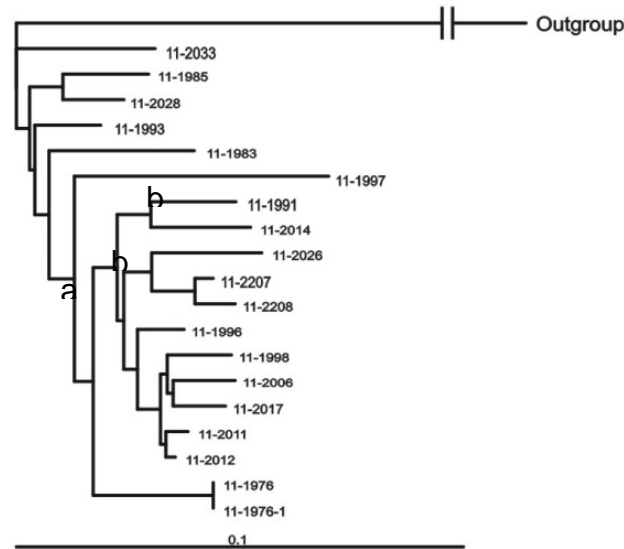


Abbildung 3 Beispiel eines Neighbor-Joining Stammbaumes

a = gemeinsamer Knoten der gesamten Clade, b = Knoten

Man nimmt derzeit an, dass die Gruppe M von HIV-1 durch die Übertragung von SIV des Schimpansen auf den Menschen entstand und sich erst durch Mensch zu Mensch Übertragung unterschiedliche phylogenetische Entwicklungslinien (Clades = multiple phylogenetische Cluster) etablierten, die als Grundlage für die Einteilung von HIV-1 in unterschiedliche Subtypen dienen. Je nach untersuchtem Genomabschnitt unterscheiden sich die Subtypen auf Nukleotidebene ca. 20 % bis 30 % voneinander.⁴²

Um Aussagen über die statistische Signifikanz einer Baumtopologie zu erhalten, wird zusätzlich die Bootstrap-Analyse durchgeführt. Dafür wird das Alignment aus BioEdit in das Programm Seqboot des PHYLIP-Package eingeladen. Dieses erzeugt Pseudodaten indem es die Positionsspalten im Alignment bezüglich ihrer Anordnung vertauscht. Dadurch wird die Auswirkung dieser Positionsänderung auf dem Baum überprüft. Bei einer Anzahl von 1000 Replikaten werden somit 1000 unterschiedliche Alignments (Pseudodaten) erstellt. Die erhaltene Datei durchläuft ebenfalls die Programme Dnadist und Neighbor Joining. Anschließend erhält man einen Stammbaum, welcher in das Consense-Programm von PHYLIP eingeladen wird. Dieses Programm liefert eine Textdatei, welche die Bootstrap-Werte der einzelnen Knoten im Stammbaum enthält. Knoten mit einem Bootstrap-Wert ab 70 % gelten als signifikant, da dann eine Übereinstimmung von 70 % vorliegt, sodass man davon

ausgehen kann, dass sich das Cluster, das von diesem Knoten ausgeht immer wieder so bilden wird.⁴⁰

3 Ergebnisse

3.1 Studienpanel: HIV-1 Patienten Proben aus dem Oman

Insgesamt standen 84 Patientenproben aus dem Oman zur Verfügung. Davon wurde ein Studienpanel von 77 Isolaten HIV-1-infizierter Patienten untersucht. (Tab. 1).

Tabelle 1 Zusammenfassung Studienpanel

Charakteristika der Studienpopulation		Gesamt	prozentualer Anteil (%)
PR/RT-PCR		77	100
positiv		52	67,5
negativ		25	32,5
Subtypisiert		47	61,0
Int-PCR		47	61,0
positiv		41	53,2
negativ		6	7,8
Subtypisiert		40	51,9
Geschlecht	Männlich	43	55,8
	Weiblich	34	44,2
Risikogruppe	MSM	6	7,8
	HET	23	29,9
	IDU	7	9,1
	Blutprodukte	2	2,6
	PPI	2	2,6
	Unbekannt	37	48,1
Therapiestatus	Therapie	53	68,8
	Therapiepause	2	2,6
	Naiv	19	24,7
	Unbekannt	3	3,9

Das Studienpanel besteht zu 55,8 % aus Männern und 44,2 % aus Frauen. Es waren folgende Risikogruppen vertreten: MSM (men who have sex with men), HET (heterosexuelle Kontakte), IDU (injecting drug user, Drogenkonsumenten), PPI (postpartale Infektion, Muttermilch) sowie die Infektion über Blut- bzw. Blutprodukte. Für 48,1 % der Patienten gab es keine Angabe zur Risikogruppe. Der Großteil der Patienten wird derzeit mit antiretroviralen Medikamenten behandelt (68,8 %) oder befindet sich in einer Therapiepause (2,6 %). Ein Viertel der Patienten ist therapienaiv (24,7 %).

3.2 Subtyp-generische Amplifikation der Integrase von HIV-1

Alle 47 Proben, für die eine Sequenz der PR/RT-Region aus vorangegangenen Analysen, existierte, wurden in der *int*-916-PCR untersucht. Bei 41 Isolaten (87 %) konnte ein spezifisches PCR-Produkt (Abb.4) amplifiziert werden. Drei Isolate, die von therapierten Patienten stammten, konnten nicht amplifiziert werden. Zwei dieser Isolate hatten eine Viruslast unter 1000 Kopien/mL, was für die PCR nicht ausreichend ist. Die dritte Probe hatte trotz Therapie eine ausreichend hohe Viruslast, konnte aber dennoch nicht mit der PCR amplifiziert werden. Von drei weiteren Proben war kein Untersuchungsmaterial vorhanden.

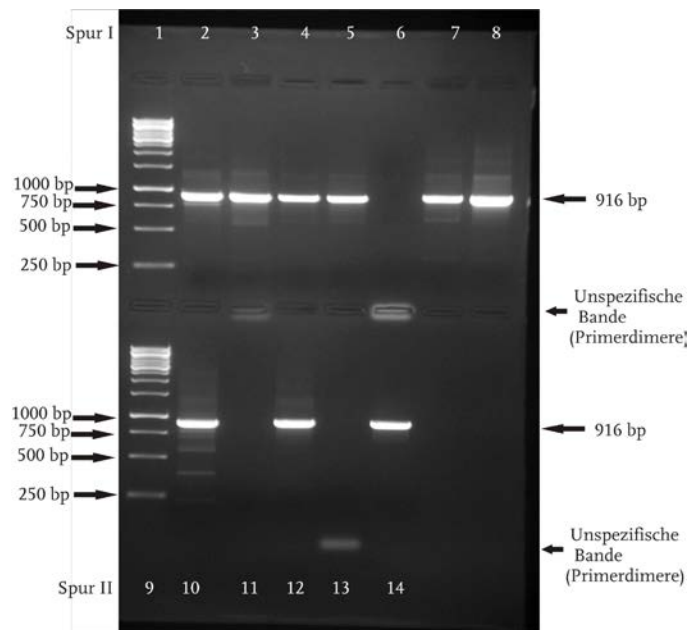


Abbildung 4 Qualitative Auswertung der *int*-PCR-Produkte der Oman-Proben

Gelelektrophorese zur Darstellung des PCR-Produktes *int* 916 bp, Agarosegel 1,5 %ig, angefärbt mit Ethidiumbromid Spurbelegung: 1: 1 kb DNA Ladder, 2: 11-1981, 3: 11-1983, 4: 11-1985, 5: 11-1988, 6: 11-1998, 7: 11-1991, 8: 11-1993, 9: 1 kb DNA Ladder, 10: 11-1998, 11: 11-1997, 12: 11-1996, 13: NK (HIV-negatives Blutplasma), 14: PK (HTLV_{III}B mit 1×10^4 Kopien/mL)

3.3 Genotypische Klassifizierung der Integrase von HIV-1

Die genotypische Klassifizierung der *int*-Sequenzen des Studienpanels erfolgte mittels phylogenetischer Analyse mit dem PHYLIP-Package 3.69 anhand etablierter Referenzviren (Subtyp Referenzpanel Los Alamos, 2010). Nach der wurde eine Distanzmatrix nach dem Kimura 2-Parameter-Modell erstellt und anschließend mit dem Neighbor-Joining-Modell aus dieser Matrix ein Stammbaum abgeleitet. Die Signifikanz des Baumes wurde mit der Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten überprüft. Als Outgroup wurde die Referenzsequenz CPZ_US.85M (Acc. No. AF103818) definiert.

Von 40 HIV-Isolaten aus dem Oman konnte so erstmals der *int*-Subtyp bestimmt werden. Im Stammbaum sind die Clades der Subtypen A1, B, C und D mit Patientenproben zu erkennen (Abb. 5).

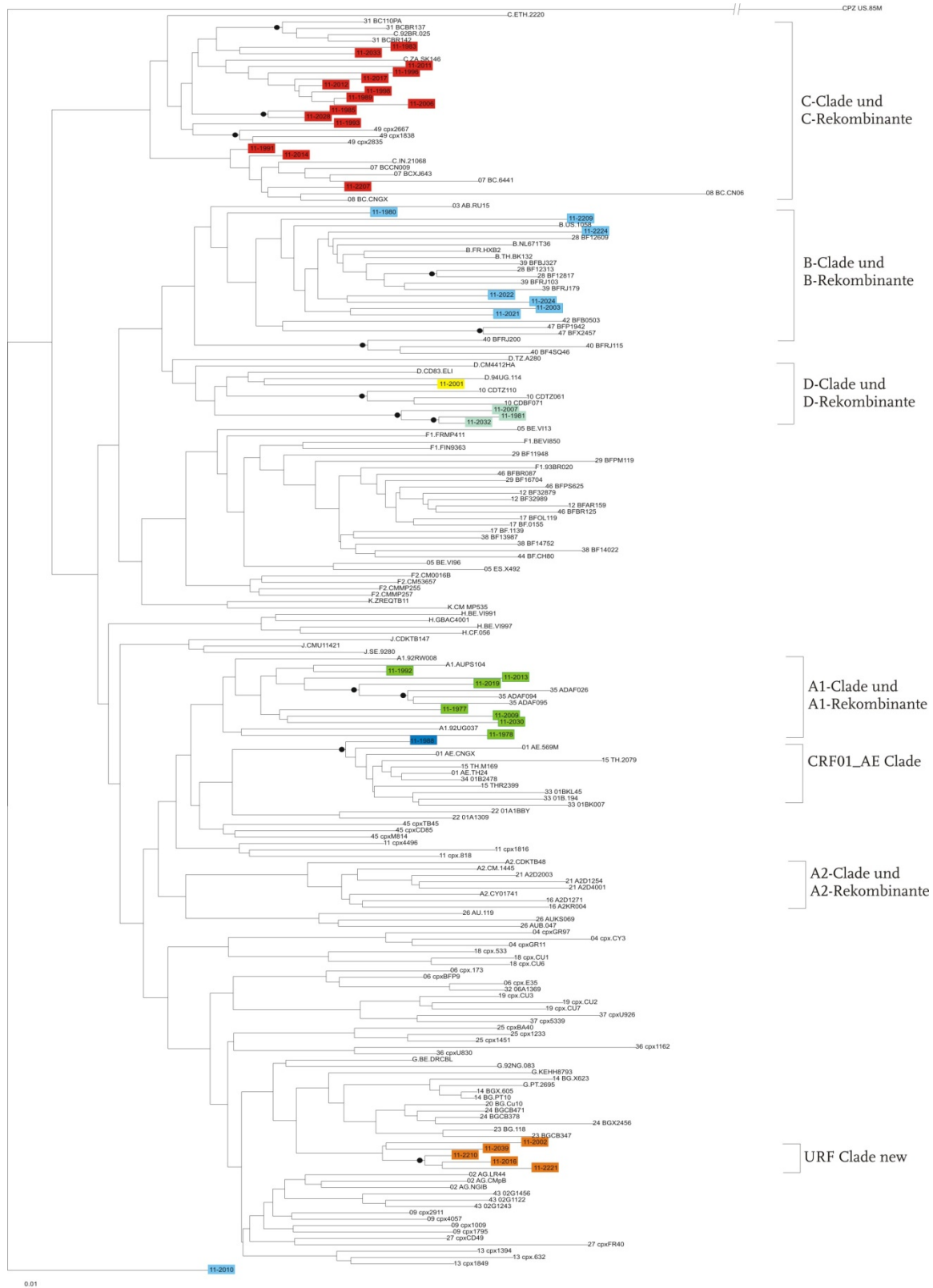


Abbildung 5 Stammbaum der *int*-Region der Patientenisolats aus dem Oman Referenzsequenzen (n=159/170) und Patientenproben (n=40) im Neighbor-Joining Stammbaum. Die Klammern markieren die Subtypen und die dazugehörigen rekombinanten Formen. Omanproben sind farblich hervorgehoben und die Lokalisation in einer Clade entspricht dem jeweiligen Subtyp bzw. der rekombinanten Form. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt. Ermittelte Signifikanzwerte (>70 %) der Proben sind als Kreise an den dazugehörigen Knoten eingetragen

Die C-Clade ist aufgrund nicht signifikanter Bootstrap-Werte nicht von C-Rekombinanten abzuspalten. Dieser C-Clade/ C-Rekombinante sind 15 Isolate zuzuordnen. Die Isolate 11-1989, 11-1996, 11-1998, 11-2006, 11-2011, 11-2012 und 11-2017 (rot in Abb. 5) sind am nächsten mit einem C-Referenzisolat aus Zaire verwandt. Drei weitere Isolate (11-1985, 11-1993 und 11-2028) spalten sich signifikant innerhalb der C- und C-rekombinanten Clade ab. Diese Isolate besitzen einen Subtyp C-Anteil und einen weiteren, aus dem Baum nicht ablesbaren, Anteil.

Acht Isolate konnten dem Subtyp B und den dazugehörigen rekombinanten Formen, die überwiegend B-Anteil besitzen, zugeordnet werden. Auch innerhalb der B-Clade spalten sich die B-Rekombinanten nicht signifikant ab, sodass die Patientenproben der B-Clade dem B-Subtyp/B-Rekombinante zugeordnet werden. Die Probe 11-2010 (blau, unten in Abb. 5) ist ebenfalls ein B-rekombinantes Isolat. Durch eine hohe genetische Divergenz clustert es jedoch außerhalb des Baumes.

Die A1-Clade kann in Abb. 5 von den A1-rekombinanten Formen getrennt werden, da sich diese signifikant innerhalb der Clade abspalten. Sechs Isolate können dem Subtyp A1 und ein Isolat kann den A1-rekombinanten Formen zugeordnet werden. Die Patientenprobe 11-2019 ist eine A/D-rekombinante Form, die sich signifikant mit den Referenzsequenzen 35 ADAF026, 35 ADAF095 und 35ADAF96 abspaltet.

Auch für die D-Clade und die D-rekombinanten Formen ist eine signifikante Unterscheidung möglich. Das Isolat 11-2001 besitzt die größte Verwandtschaft zu der Referenzsequenz D.94.UG.114. Innerhalb der D-Clade spalten sich die drei Patientenproben 11-1981, 11-2007 und 11-2032 signifikant ab und clustern mit keiner bekannten Referenzsequenz, sodass man hier von Isolaten sprechen kann, die einen Subtyp D-Anteil und einen weiteren unbekanntem Anteil besitzen, jedoch nicht signifikant eine eigene URF-Clade darstellen.

Ein Isolat (11-1988) ist der rekombinanten Form CRF01_AE, die im dargestellten Baum signifikant abgespalten ist, zuzuordnen.

Fünf Isolate (orange in Abb. 5) bilden eine eigene monophyletische Gruppe, die überwiegend aus Anteilen des Subtyps G und A besteht. Da sich diese Clade signifikant von bekannten Referenzsequenzen abspaltet und fünf Isolate darin lokalisiert sind wird sie als neue URF bezeichnet. Die größte Sequenzidentität besteht zu Isolaten aus Kuba (Bsp. Sequenzidentität von Isolat 11-2221 zu DB-Isolat Cu74 beträgt 95 %), Kamerun und Senegal.

Die Tabelle 2 zeigt eine Übersicht aller, mit Integrase Sequenzen, subtypisierter Isolate aus dem Oman.

Tabelle 2 Klassifizierter *int*-Subtyp der einzelnen Isolate aus dem Oman

Subtyp	Isolat
A1	11-1977, 11-1987, 11-1992, 11-2009, 11-2013, 11-2030
A1-Clade A1-Rekombinante	11-2019
B-Clade und B-Rekombinante	11-1980, 11-2003, 11-2021, 11-2022, 11-2024, 11-2209, 11-2224, 11-2010
C-Clade und C-Rekombinante	11-1983, 11-1985, 11-1989, 11-1991, 11-1993, 11-1996, 11-1998, 11-2006, 11-2011, 11-2012, 11-2014, 11-2017, 11-2028, 11-2033, 11-2207
D-Clade und D-Rekombinante	11-2001
CRF01_AE	11-1988
URF (D/U*)	11-1981, 11-2032, 11-2007
URF (G/A)	11-2016, 11-2039, 11-2210, 11-2221, 11-2002

*U=unbekannter Anteil

Die prozentuale Verteilung dieser Proben ist in der folgenden Grafik dargestellt (Abb. 6).

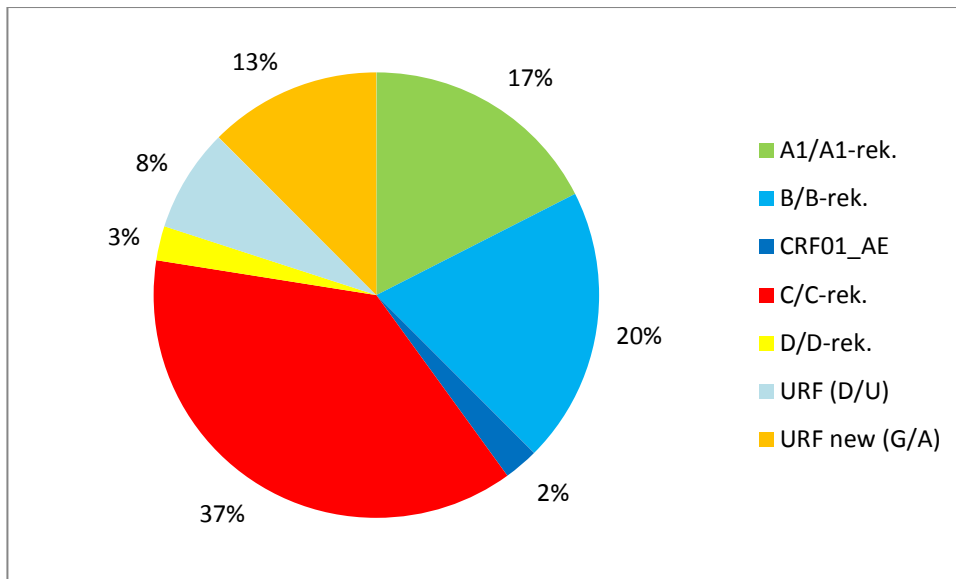


Abbildung 6 Prozentualer Anteil der *int*-Subtypen der Proben aus dem Oman
Neighbor-Joining Stammbaum Analyse der *int*-Region HIV-1 infizierter Patienten aus dem Oman. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt (K-2-P).

Der Großteil der Proben konnte mit 37% (n=15) dem Subtypen C/C-rekombinante zugeordnet werden. 20 % (n=8) der Proben sind dem Subtyp B/B-rekombinante Formen und 17 % (n=7) dem Subtyp A1 und den jeweiligen rekombinanten Formen zugehörig. In der Integrase konnten fünf Isolate (13 %) klassifiziert werden, die einer neuen, bislang unbekannt Form angehören (URF new). Weitere 8 % (n=3) der untersuchten Patientenproben konnten als URF mit Subtyp D-Anteil klassifiziert werden und 3 % (n=1) sind dem Subtyp D zugehörig. 2 % der analysierten Proben sind rekombinante Formen der CRF01_AE.

3.4 Vergleichende phylogenetische Analyse der PR/RT-Region, der INT-Region und der PR/RT/INT-Region von HIV-1 aus dem Oman

In vorangegangenen phylogenetischen Untersuchungen wurde der Subtyp der PR/RT-Region der Proben aus dem Studienpanel bestimmt. 23 % der Proben wurden als Mosaikviren identifiziert, die als CRF oder URF zu klassifizieren sind. Für detailliertere Informationen über die Genomstruktur der Mosaikviren wurden vergleichende phylogenetische Analysen der PR/RT-Region, der INT-Region und der zusammengesetzten Sequenzen beider Genregionen (PR/RT/INT-Region) durchgeführt (Abb. 7).

In der Abbildung 7 sind die drei Stammbäume dargestellt. Im Stammbaum C (PR/RT-Sequenzen, unten in Abb. 7) wurden 47 Isolate klassifiziert. Sechs Sequenzen konnten dem Subtyp A1 und A1-Rekombinanten zugeordnet werden. Für acht Isolate wurde der Subtyp B/B-rekombinante Formen bestimmt. 19 Isolate wurden als Subtyp C klassifiziert. Drei weitere Patientenproben sind D/D-rekombinante Formen. Als URF mit einem D-Anteil und einem unbekanntem Anteil konnten vier Isolate klassifiziert werden. Sechs Isolate konnten als eine neue bislang nicht bekannte URF klassifiziert werden. Diese Isolate besitzen in der PR/RT-Region, im Gegensatz zur INT-Region (G/A), Anteile der Subtypen G und D.

Im Stammbaum A (POL-Region, oben in Abb. 7) konnte eine Probe der rekombinanten Form CRF01_AE zugeordnet werden. Je sieben Sequenzen den Subtypen A1/A1-rekombinant und B/B-rekombinant zuzuordnen. 15 Isolate konnten auch hier als Subtyp C/C-rekombinant klassifiziert werden, sowie zwei Proben als D-rekombinante Formen. Als URF mit Subtyp D und einem unbekanntem Anteil sind drei Isolate zu klassifizieren und fünf Proben konnten auch hier als neue bislang unbekannte URF klassifiziert werden. Diese Isolate besitzen anteilig die Subtypen G und A.

Zu den Subtypen C und D mit den dazugehörigen rekombinanten Formen sowie beiden URFs sind im Stammbaum C (PR/RT, unten in Abb. 7) mehr Isolate zuzuordnen als vergleichsweise zu dem Bäumen A und B. Im Stammbaum C sind 19 Proben in der C/C-Rekombinante-Clade lokalisiert, wobei in den anderen beiden Bäumen nur 15 Isolate in dieser Clade zu finden sind. Dem Subtyp A/A-Rekombinante sind in der INT- und in der zusammengesetzten Region mehr Isolate zuzuordnen als in der PR/RT-Region. B/B-rekombinante Formen konnten in mehr Isolaten in der INT- und PR/RT-Region gefunden werden, als in der zusammengesetzten Region. Der Subtyp CRF01_AE konnte in allen drei Bäumen einmal zugeordnet werden.

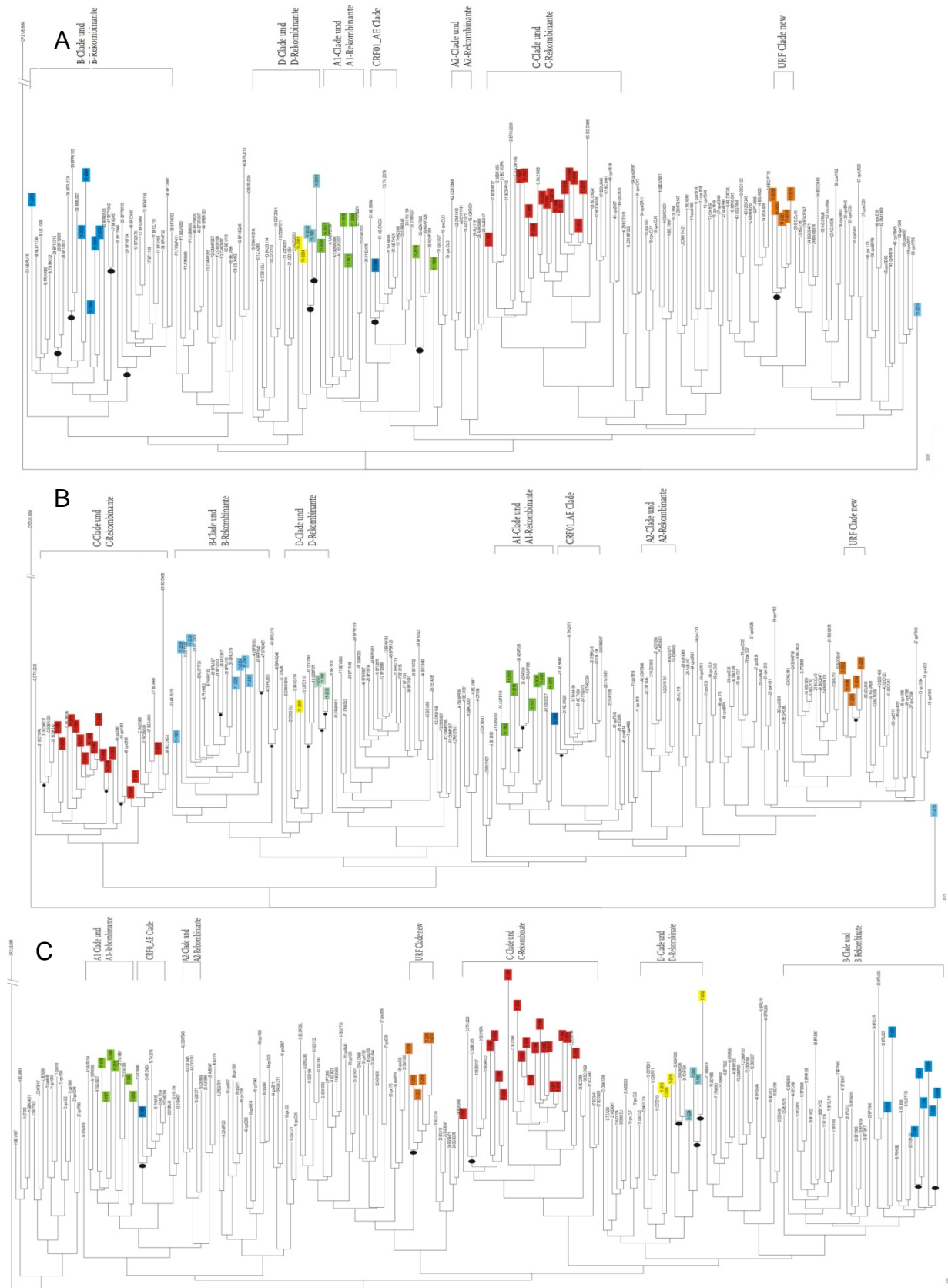


Abbildung 7 Stammbäume der untersuchten Genregionen

Neighbor-Joining Stammbaum mit Referenzsequenzen (n=159) und Patientensequenzen; Oben: PR/RT-Region (n=47), Mitte: *Int*-Region (n=40), Unten *pol*-Region (n=40); Subtypen sind durch Klammern markiert. Bootstrap (K-2-P, 1000 Replikate) durch Kreise markiert >70%; Scale bar: 0,1=10% Nukleotidaustausch pro Position im Alignment, Stammbäume in Originalgröße im Anhang.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Subtypen in den unterschiedlichen Genregionen ist in den folgenden Grafiken dargestellt.

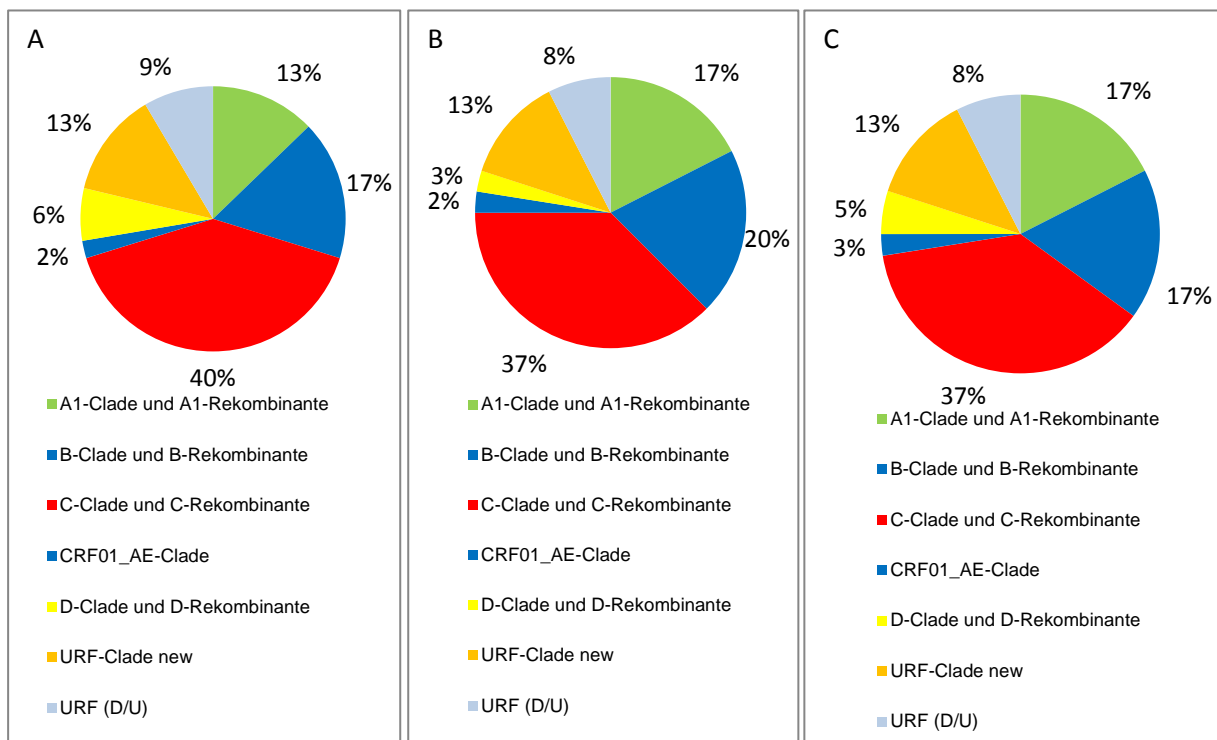


Abbildung 8 Prozentuale Verteilung der Subtypen in den Genregionen

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den jeweiligen Neighbor-Joining Stammbäumen, Links: *PR/RT*-Region (n=47), Mitte: *Int*-Region (n=40), Rechts: *PR/RT-Int*-Region (n=40)

Die prozentuale Verteilung innerhalb der einzelnen Clades ist im Vergleich der drei Genregionen ähnlich. In allen drei Genregionen ist der Großteil der Proben dem Subtyp C zuzuordnen, wobei in der Protease/Reverse Transkriptase (Abb. 8, A) mehr Isolate zu finden sind. Für den Subtypen D und seine rekombinanten Formen, sowie für die URF (D/U) befinden sich ebenfalls mehr Isolate in der PR/RT-Region. Subtyp A und A-Rekombinanten sind anteilig in der Integrase mehr vertreten (17 %) als in der PR/RT. Der prozentuale Anteil für B/B-Rekombinant ist in der INT höher (20 %) als in der PR/RT (17 %). Die neue monophyletische Gruppe (URF new) ist in allen Analysen mit dem gleichen prozentualen Anteil vertreten (13 %). Die rekombinante Form CRF01_AE ist in der POL-Region mit 3 % häufiger lokalisiert als in den anderen beiden Regionen.

In der folgenden Tabelle 3 sind die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen zusammengefasst.

Tabelle 3 Übersicht der klassifizierten Subtypen zu den analysierten Genregionen (*pr/rt, int, pol*-gesamt, n=40)

Sample	PR/RT	Int	pol	Sample	PR/RT	Int	pol
11-01977	A1	A1	A1/A1-Rek.	11-01993	C	C/C-Rek.	C
11-01978	A1	A1	A1/A1-Rek.	11-01996	C	C/C-Rek.	C
11-01992	B	A1	A1/A1-Rek. (A/D)	11-01998	C	C/C-Rek.	C
11-02009	A1	A1	A1/A1-Rek.	11-02006	C	C/C-Rek.	C
11-02013	A1	A1	A1/A1-Rek.	11-02011	C	C/C-Rek.	C
11-02030	A1	A1	A1(A1-Rek.	11-02012	C	C/C-Rek.	C
11-02019	D/D-Rek.	A1/A1-Rek. (A/D)	A1/A1-Rek. (A/D)	11-02014	C	C/C-Rek.	C
11-01980	B/B-Rek.	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-02017	C	C/C-Rek.	C
11-02003	B/B-Rek.	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-02028	C	C/C-Rek.	C
11-02021	B/B-Rek.	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-02033	C	C/C-Rek.	C
11-02022	B/B-Rek.	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-02207	C	C/C-Rek.	C
11-02024	B/B-Rek.	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-02001	A1	D/D-Rek.	D/D-Rek.
11-02209	B	B/B-Rek.	B/B-Rek.	11-01981	URF (D/U)	URF (D/U)	URF (D/U)
11-02224	URF (D/U*)	B/B-Rek.	D/D-Rek.	11-02032	URF (D/U)	URF (D/U)	URF (D/U)
11-02010	D/D-Rek. (D/C)	B/C-Rek.	B/C-Rek.	11-02007	URF (D/U)	URF (D/U)	URF (D/U)
11-01988	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE	11-02016	URF new (G/D)	URF new (G/A)	URF new (G/A)
11-01983	C	C/C-Rek.	C	11-02039	URF new (G/D)	URF new (G/A)	URF new (G/A)
11-01985	C	C/C-Rek.	C	11-02210	URF new (G/D)	URF new (G/A)	URF new (G/A)
11-01989	C	C/C-Rek.	C	11-02221	URF new (G/D)	URF new (G/A)	URF new (G/A)
11-01991	C	C/C-Rek.	C	11-02002	URF new (G/D)	URF new (G/A)	URF new (G/A)

* U=unbekannter Anteil

Mit Hilfe der phylogenetischen Analysen konnte für 67,5 % der Patientenproben aus dem Oman derselbe Subtyp für die PR/RT-, INT- und der zusammengesetzten Sequenz aus beiden, die fast die gesamte POL-Region bestimmt werden. Die restlichen 32,5 % wurden als rekombinante Formen klassifiziert (URF (D/U) 7,5 %, URF new 12,5 %, andere Rekombinante 12,5 %).

4 Diskussion

Nach Angabe von UNAIDS wurden bislang 2164 HIV-Infektionen im Oman registriert³⁴. Zur Klassifizierung dieser Infektionen lagen bislang jedoch keine Daten vor. Anhand eines Studienpanels HIV-1-positiver Patienten aus dem Oman, die der Arbeitsgruppe zu genotypischen Resistenzanalysen zur Verfügung stehen, wurde zunächst die PR/RT-Region subtypisiert. 23 % (11/47) konnten als rekombinante Viren klassifiziert werden⁴³.

In der vorliegenden Arbeit wurde anschließend die Integrase-Region mit einer subtyp-generischen PCR amplifiziert und klassifiziert. Ziel dieser Arbeit ist es eine Sequenzanalyse des nahezu vollständigen *pol*-Genomabschnittes von HIV-1 Varianten aus dem Oman durchzuführen.

4.1 Verwendung einer subtyp-generischen RT-PCR zur Amplifikation der Integrase von HIV-1 Isolaten aus dem Oman

Mit Hilfe einer subtyp-generischen Integrase-PCR konnte die Amplifikation von HIV-1 Isolaten aus dem Oman durchgeführt werden.

Insgesamt konnte für 87 % (41/47) der Patientenproben die Integrase-Region amplifiziert werden. Die restlichen Proben, die nicht amplifiziert werden konnten, besaßen mit weniger als 1000 Kopien/mL eine Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze für diese PCR und gehören in der PR/RT-Region dem Subtyp C an. In vorangegangenen Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe wurde für die Amplifikation der Integrase-Region von Subtyp C-Viren, sowie Vertretern der Subtypen A und CRF01_AE, eine geringere Nachweisgrenze gezeigt, als für die meisten anderen Subtypen.⁴⁴ Eventuell können die PCR-negativen Proben mit modifizierten Primern amplifiziert werden.

4.2 Genetische Klassifikation der Integrase von HIV-1 aus dem Oman

Die Klassifizierung der Integrase-Region von HIV-1 erfolgte anhand phylogenetischer Neighbor-Joining Analysen mit dem Subtypreferenzpanel (Position 4023-5096 HXB2).

Ein Großteil von 79 % der Isolate (32/40) war einem klar definierten Subtyp oder einer Rekombination mit Hauptanteilen eines Subtypen zuzuordnen. Zuordnungen in einem Cluster, in dem ein Subtyp und die rekombinante Form zusammengefasst sind, waren für die Integrase, wie auch für den Genombereich *pr/rt*, notwendig, da die Cluster-relevanten Knoten keine signifikanten Bootstrap-Werte besitzen, wodurch eine feinere Auftrennung nicht möglich ist. Die restlichen 21 % (8/40) wurden als rekombinante mit unbekanntem Anteil (URF) klassifiziert. In der C/C-Rekombinanten sind 8 Isolate lokalisiert, die sich signifikant abspalten. Alle Isolate stammen von selben Einsender und gehören, bis auf eines, der Risikogruppe IDU an. Eine epidemische Verknüpfung dieser Isolate wird vermutet. Fünf (URF new) Isolate bilden eine monophyletische Gruppe, mit Anteilen von Subtyp D, G und unbekanntem Sequenz-abschnitten, die keiner bislang bekannten rekombinanten Form zuzuordnen ist. Die Größte Sequenzidentität besteht zu Isolaten aus Kuba, Kamerun und Senegal.

4.3 Klassifizierung der Genregionen *pr/rt* und *int*

Die vergleichende Analyse der beiden Genregionen *pr/rt* und *int* zeigten eine Übereinstimmung des Subtypen für 87,5 % (35/40) der Isolate. Nur bei 12,5 % (5/40) konnte ein anderer Subtyp in der INT-Region klassifiziert werden, als in der PR/RT-Region. Diese rekombinanten Formen besitzen einen Subtyp A1- oder D-Anteil. Dies zeigt, dass die Rekombination nicht an einen bestimmten Genabschnitt gebunden ist, da es möglich ist rekombinante Formen klar als solche, in beiden untersuchten Regionen, zu bestimmen (URF new). Die Mosaikstruktur ist somit nicht auf einen Genabschnitt lokalisierbar, sondern zieht sich durch das gesamte Genom. Dies geht auch aus den Stammbäumen hervor, in denen die Isolate ähnliche Cluster, unabhängig von der analysierten Genregion, bilden. Würde die Rekombination an Genabschnitte gebunden sein (Bsp. funktionelle Gene), würde man anhand der phylogenetischen Analysen klare Unterschiede in der Subtypverteilung ausmachen können.

4.4 Analyse der Mosaikstruktur im *pol*-Gen von HIV-1 Isolaten aus dem Oman

Durch das künstliche Zusammenführen der Sequenzen der PR/RT- und der INT-Region erhält man nahezu das gesamte POL-Fragment des HIV-1 Genoms. Dies ermöglicht es den Subtypen dieser Region festzulegen. Für 87,5 % der Patientenproben konnte eindeutig ein Subtyp klassifiziert werden, da die einzelnen Fragmente demselben Subtyp zuzuordnen sind.

In allen drei Stammbäumen (Abb. 7) ist eine signifikante Clusterung von Proben zu erkennen, die mit keinen bekannten Referenzen einhergehen. Die im Praxisbericht (Juni 2012) geäußerte Vermutung, dass es sich um eine neue bislang unbekannte URF handelt, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert. Um dies jedoch mit Sicherheit sagen zu können, ist eine full-length Sequenzierung der Proben Voraussetzung.

Innerhalb der phylogenetischen Untersuchungen schwank der prozentuale Anteil von Subtyp B zwischen 15-17 %. Dies ist durch B-rekombinante Formen mit anderen Subtypen zu erklären. Für die Proben, welche den Subtypen B in keinem signifikanten Cluster mit einer Referenzsequenz aufweisen, können keine genauen Aussagen über mögliche B-rekombinante Formen und die Herkunft getroffen werden. Dafür sind weitere Analysen anzuschließen, die mehr Auskunft über das Genom liefern, sowie eine mögliche BLAST-Suche, um die Verwandtschaft zu anderen Isolaten zu ermitteln.

Für das Isolat der CRF01_AE kann die höchste Übereinstimmung auf Nucleotidebene mit einem Isolat aus Afghanistan festgestellt werden.

Im Oman wurden Isolate mit

Die Komplexität der im Oman identifizierten rekombinanten Isolate und die Tatsache, dass manche Anteile dieser Mosaikstrukturen als reine Subtypen in den untersuchten Proben nicht vorkam (z.B. Subtyp G und J) könnte bedeuten, dass diese rekombinanten Formen in Regionen außerhalb des Oman mit hoher HIV-Prävalenz und hoher HIV-Diversität entstanden sind.

In dieser Arbeit konnten erstmals HIV-1 Proben von Patienten aus dem Oman subtypisiert werden. Für genauere Aussagen bezüglich der Subtypen, sind weitere Genomanalysen nötig. Eine anschließende BLAST-Suche könnte einen genaueren Hinweis auf den Ursprung der einzelnen Subtypen liefern.

4.5 Ausblick

Um die neue URF als mögliche neue CRF zu klassifizieren ist eine full-length Sequenzanalyse nötig. Dafür wird frisches EDTA-Blut der Patienten benötigt, mit dem eine Virusanzucht der Viren durchgeführt wird.

Des Weiteren ist ein Screening HIV-positiver Proben aus dem Oman geplant, um ein genaueres Bild über die molekulare Epidemiologie im Oman zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Die hohe Mutationsrate und die fehlenden Korrektur-Funktion der Reversen Transkriptase führen bei HIV-1 zu einer hohen genetischen Diversität. Obwohl sich die Subtypen der epidemiologisch relevanten Gruppe M von HIV-1 serologisch nicht unterscheiden, sind sie geographisch sehr unterschiedlich verbreitet. Inwiefern biologische Unterschiede der genetischen Varianten vorliegen und die unterschiedliche Verbreitung beeinflussen, ist Thema zahlreicher Studien.

Für das Sultanat Oman gab es bisher keine Daten zum Vorkommen und zur Verbreitung der HIV-1 Subtypen. Anhand von HIV-1 infizierten Proben aus dem Oman, die der Arbeitsgruppe zur genotypischen Resistenzanalyse zur Verfügung standen, wurde deshalb erstmals die Subtypisierung omanischer HIV-1 Isolate durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 47 der Isolate, für die bereits die PR/RT-Region subtypisiert vorlag, für die Klassifizierung der Integrase-Region ausgewählt

Zunächst wurde die virale RNA aus dem Blutplasma HIV-1 positiver Patienten extrahiert, in cDNA ungeschrieben und amplifiziert. Nach einer Aufreinigung mittels Kit, sowie qualitativen und quantitativen Analysen über eine Agarosegelelektrophorese wurde die Populationssequenz der Proben für phylogenetische Analysen ermittelt. Die Subtypisierung wurde anhand phylogenetischer Neighbor-Joining Analysen mit dem Subtypferenzpanel der Los Alamos Datenband durchgeführt. Insgesamt konnte die INT-Sequenz von 40 Proben ermittelt werden (PCR-neg. n=3). Aus den Stammbäumen ergab sich folgende Subtypenverteilung: C 37 %, A1 17 %, B 20 %, D 3 %, URF (D/U) 8 % und CRF01_AE 2 %. 13 % der Isolate konnten signifikant als eine neue bisher nicht bekannte URF klassifiziert werden. Um dies zu bestätigen muss eine full-length-Sequenzierung dieser Proben durchgeführt werden. Die vergleichenden Analysen, der PR/RT-Region mit der INT-Region, zeigten, dass 85 % der Isolate der gleichen Subtyp in beiden Genregionen zuzuordnen ist.

Diese Arbeit trägt mit den vorangegangenen Analysen einen Beitrag zu der Verteilung der epidemisch relevanten Subtypen und CRFs im Sultanat Oman bei.

6 Summary

Because of high mutation and recombination rates of the reverse transcriptase enzyme, which lacks a proof-reading mechanism, HIV has a high genetic variability. Currently there are nine different subtypes and recently 54 CRFs of the epidemical relevant group M, which do not differ serologically but with regard to their geographic distribution. The correlation of biological characteristics and subtype classification is subject of numerous studies.

There is no data about the distribution of the different HIV-1 subtypes in Oman yet. Samples from HIV-1 infected patients from Oman, patients previously tested for antiretroviral drug resistance were available, which were to analyse the genetic subtype for the first time. In this work 47 samples were chosen to determine the subtype of the INT-gene. For these samples the PR/RT-subtype was already analysed.

The RNA was extracted from blood plasma and cDNA was created, followed by qualitative and quantitative analyses via agarose gel electrophoresis. The last step was to produce the individual INT-sequences to perform phylogenetic analyses with the neighbor-joining method. To determine the HIV-1 subtypes the current reference subtype panel of the Los Alamos database was used.

The INT-subtype of 40/47 patients could be determined. Three samples were PCR-negative. The majority of infections belonged to defined genetic subtypes/CRFs: C 37 %, A1 17 %, B 20 %, D 3 %, CRF01_AE 2 % and URF (D/U) 8 %. 21 % of the samples could represent diverse unique recombinant forms (URFs), five of them were determined as a new, till now not assigned, recombinant form (URF new). To proof the determination of the new URF, which could be a new CRF, full length sequencing has to be done.

The comparable phylogenetic analyses of PR/RT-sequences, INT-sequences and the linked sequences of both genome regions showed that 85 % of the sequences are the same subtype in both genome regions.

Previous studies and this work contribute the knowledge about the spread of epidemical relevant subtypes and recombinant form in Oman.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **1**, a006841, doi:10.1101/cshperspect.a006841 (2011).
- 2 CDC. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California. 305-308 (1981).
- 3 Greene, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. *European journal of immunology* **37 Suppl 1**, S94-102, doi:10.1002/eji.200737441 (2007).
- 4 CDC. Pneumocystis Pneumonia -- Los Angeles. 729-733 (1996).
- 5 Goudsmit, J. *Viral sex: the nature of AIDS*. (Oxford University Press, Inc., 1997).
- 6 Montagnier, L. 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* **397**, 248-254, doi:10.1016/j.virol.2009.10.045 (2010).
- 7 CDC. Public Health Then and Now: Celebrating 50 Years of MMWR (2011).
- 8 Barre-Sinoussi, F. HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement. *Virology* **397**, 255-259, doi:10.1016/j.virol.2009.08.033 (2010).
- 9 Gallo, R. C. & Montagnier, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England journal of medicine* **349**, 2283-2285, doi:10.1056/NEJMp038194 (2003).
- 10 Gallo, R. C. Historical essay. The early years of HIV/AIDS. *Science* **298**, 1728-1730, doi:10.1126/science.1078050 (2002).
- 11 Hemelaar, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine* **18**, 182-192, doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001 (2012).
- 12 Merson, M. H., O'Malley, J., Serwadda, D. & Apisuk, C. The history and challenge of HIV prevention. *Lancet* **372**, 475-488, doi:10.1016/S0140-6736(08)60884-3 (2008).
- 13 UNAIDS. Report on the Global AIDS Epidemic 2010. (2010).
- 14 WHO/UNAIDS/UNICEF. 2011 Progress Report on global HIV/AIDS response. (2011).
- 15 Hoffmann, C. & Rockstroh, J. (Medizin Fokus Verlag, 2011).
- 16 Aghokeng, A. F. *et al.* Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **10**, 386-396, doi:10.1016/j.meegid.2009.04.014 (2010).
- 17 Klatt, N. R., Silvestri, G. & Hirsch, V. Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a007153, doi:10.1101/cshperspect.a007153 (2012).
- 18 Plantier, J. C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* **15**, 871-872, doi:10.1038/nm.2016 (2009).
- 19 de Sousa, J. D., Muller, V., Lemey, P. & Vandamme, A. M. High GUD incidence in the early 20 century created a particularly permissive time window for the origin and initial spread of epidemic HIV strains. *PloS one* **5**, e9936, doi:10.1371/journal.pone.0009936 (2010).
- 20 Van Heuverswyn, F. *et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164, doi:10.1038/444164a (2006).
- 21 Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-614 (2000).
- 22 Keele, B. F. *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523-526, doi:10.1126/science.1126531 (2006).

- 23 Vallari, A. *et al.* Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology* **85**, 1403-1407, doi:10.1128/JVI.02005-10 (2011).
- 24 Robertson, D. L. *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56 (2000).
- 25 Ratner, L. *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284 (1985).
- 26 Somogyi, S. Divergente Transkriptionskontrolle von HIV-1: Strukturelle und funktionale Analyse des LTR-Promoters der Gruppe M, N und O. (2002).
- 27 Demeulemeester, J., Tintori, C., Botta, M., Debyser, Z. & Christ, F. Development of an AlphaScreen-based HIV-1 integrase dimerization assay for discovery of novel allosteric inhibitors. *Journal of biomolecular screening* **17**, 618-628, doi:10.1177/10870571111436343 (2012).
- 28 Delelis, O., Carayon, K., Saib, A., Deprez, E. & Mouscadet, J. F. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* **5**, 114, doi:10.1186/1742-4690-5-114 (2008).
- 29 Ceccherini-Silberstein, F. *et al.* Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS reviews* **11**, 17-29 (2009).
- 30 Piralla, A., Paolucci, S., Gulminetti, R., Comolli, G. & Baldanti, F. HIV integrase variability and genetic barrier in antiretroviral naive and experienced patients. *Virology journal* **8**, 149, doi:10.1186/1743-422X-8-149 (2011).
- 31 Rhee, S. Y. *et al.* Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology* **5**, 74, doi:10.1186/1742-4690-5-74 (2008).
- 32 Kaplan, A. H., Manchester, M. & Swanstrom, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *Journal of virology* **68**, 6782-6786 (1994).
- 33 Datenbank, L. A.
http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/asearch/query_one.comp?se_id=142826&accession=AY444804
- 34 UNAIDS. COUNTRY PROGRESS REPORT Sultanate of Oman. (2012).
- 35 Kiwanuka, N. *et al.* Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* **197**, 707-713, doi:10.1086/527416 (2008).
- 36 Nelson, K. E., Costello, C., Suriyanon, V., Sennun, S. & Duerr, A. Survival of blood donors and their spouses with HIV-1 subtype E (CRF01_A_E) infection in northern Thailand, 1992-2007. *Aids* **21** Suppl **6**, S47-54, doi:10.1097/01.aids.0000299410.37152.17 (2007).
- 37 Sacktor, N. *et al.* HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**, 780-786, doi:10.1086/605284 (2009).
- 38 Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. (1999).
- 39 Fiedler, S. *Etablierung und Validierung einer HIV-1-spezifischen int RT-PCR zur genotypischen Resistenzbestimmung von HIV- gegenüber Integrase Inhibitoren* (2010).
- 40 Knoop, V. & Müller, K. *Gene und Stammbäume: Ein Handbuch zur molekularen Phylogenie*. 2 edn, (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
- 41 Lesk, A. *Bioinformatik: Eine Einführung*. 1 edn, (Spektrum Akademischer Verlag, 2003).

-
- 42 Korber, B. *et al.* HIV-1 intrapatient sequence diversity in the immunogenic V3 region. *AIDS research and human retroviruses* **8**, 1461-1465 (1992).
 - 43 Somogyi, S. High diversity of subtypes and circulating recombinant forms identified in HIV-1 infected patients from Oman. (2012).
 - 44 Weiß, J. *Resistenz von HIV gegen Integrase-Inhibitoren: Optimierung einer Integrase-spezifischen subtyp-generischen RT-PCR* (2011).

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

....., den

Ort

Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Claudia Kücherer für die Möglichkeit bedanken, meine Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut im Zentrum für HIV und Retrovirologie durchzuführen.

Besonderen Dank gilt Sybille Somogyi für die intensive Betreuung und die zahlreichen Gespräche während meiner Bachelorarbeit.

Ich möchte mich auch bei dem HIV-Studienlabor ganz herzlich bedanken. Bei Sabrina Neumann und Hanno von Spreckelsen für die Einarbeitung, Stefan Fiedler, Katrin Arndt, Marc Schumann, Andrea Hauser, Karolin Meixenberger und Antje Tomschegg für die vielen lustigen Momente die wir zusammen im Labor hatten. Danke auch an das Sequenzierungslabor.

Großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis während diesem Abschnitt des Studiums.

10 Appendix

Übersicht der Patientenproben

NUIdPat	SCount	Pseudo- nym	Einsender Sulta- nat of Oman	Therapie	Risiko	Alter (J)	Geschl- echt m/w
26480	11-01976	OM-001	Al Nahdha Hospital	therapiert	Blut/-produkte	40	w
26481	11-01977	OM-002	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	50	m
26482	11-01978	OM-003	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	26	w
26483	11-01979	OM-004	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	43	m
26484	11-01980	OM-005	Al Nahdha Hospital	naiv	keine Angabe	26	m
26485	11-01981	OM-006	Al Nahdha Hospital	therapiert	Homo-/bisexuell	62	m
26486	11-01982	OM-007	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	29	w
26487	11-01983	OM-008	Al Nahdha Hospital	naiv	Heterosexuelle Kontakte	50	m
26488	11-01984	OM-009	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	37	m
26489	11-01985	OM-010	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	40	w
26490	11-01986	OM-011	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	30	w
26491	11-01987	OM-012	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	38	m
26492	11-01988	OM-013	Al Nahdha Hospital	naiv	Heterosexuelle Kontakte	38	m
26493	11-01989	OM-014	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	42	m
26494	11-01990	OM-015	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	49	m
26495	11-01991	OM-017	Al Nahdha Hospital	Therapiepause	IVDA	40	m
26497	11-01992	OM-016	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	40	m
26498	11-01993	OM-018	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	46	m

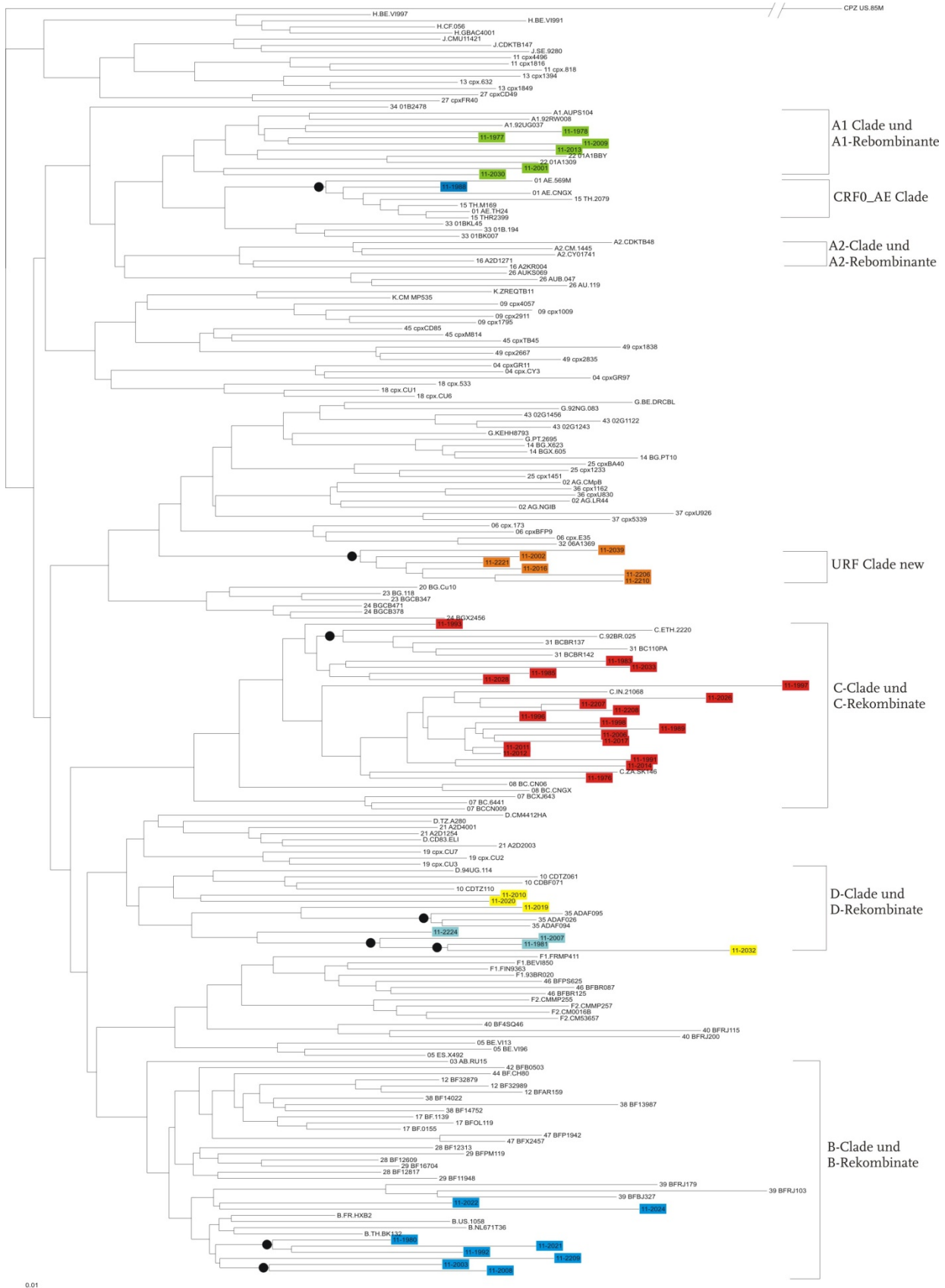
26499	11-01994	OM-019	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	43	m
26502	11-01995	OM-020	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	37	w
26503	11-01996	OM-021	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	45	m
26504	11-01997	OM-022	Al Nahdha Hospital	Therapiepause	Heterosexuelle Kontakte	41	m
26505	11-01998	OM-023	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	40	m
26505	11-01998	OM-023	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	40	m
26506	11-01999	OM-024	Al Nahdha Hospital	naiv	keine Angabe	31	w
26507	11-02000	OM-025	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	28	m
26508	11-02001	OM-026	Al Nahdha Hospital	naiv	Heterosexuelle Kontakte	33	w
26509	11-02002	OM-027	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	35	w
26510	11-02003	OM-028	Al Nahdha Hospital	therapiert	Homo-/bisexuell	46	m
26511	11-02004	OM-029	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	26	w
26512	11-02005	OM-030	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	47	m
26513	11-02006	OM-031	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	49	m
26514	11-02007	OM-032	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	34	m
26515	11-02008	OM-033	Al Nahdha Hospital	therapiert	keine Angabe	37	m
26516	11-02009	OM-034	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	20	w
26517	11-02010	OM-035	Al Nahdha Hospital	naiv	Homo-/bisexuell	23	m
26518	11-02011	OM-036	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	47	m
26519	11-02012	OM-037	Al Nahdha Hospital	naiv	IVDA	38	m
26520	11-02013	OM-038	Al Nahdha Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	51	w
26521	11-02014	OM-039	Al Nahdha Hospital	therapiert	Homo-/bisexuell	46	m
26522	11-02015	OM-040	Al Nahdha Hospital	naiv	keine Angabe	25	m

26523	11-02016	OM-041	Al Nahdha Hospital	therapiert	Homo-/bisexuell	24	m
26524	11-02017	OM-042	Al Nahdha Hospital	therapiert	IVDA	36	m
26525	11-02018	OM-043	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	47	m
26526	11-02019	OM-044	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	36	w
26527	11-02020	OM-045	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	41	m
26528	11-02021	OM-046	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	30	w
26529	11-02022	OM-047	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	30	w
26530	11-02023	OM-048	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	30	m
26531	11-02024	OM-049	Royal Hospital	therapiert	Blut/-produkte	39	m
26532	11-02025	OM-050	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	22	m
26533	11-02026	OM-051	Royal Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	35	m
26534	11-02027	OM-052	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	5	m
26535	11-02028	OM-076	Royal Hospital	therapiert	PPI	17	w
26537	11-02030	OM-078	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	51	w
26538	11-02031	OM-079	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	49	w
26540	11-02032	OM-080	Royal Hospital	therapiert	Homo-/bisexuell	36	m
26541	11-02033	OM-081	Royal Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	42	m
26542	11-02034	OM-082	Royal Hospital	naiv	keine Angabe	40	w
26543	11-02035	OM-083	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	52	m
26545	11-02037	OM-085	Royal Hospital	therapiert	keine Angabe	22	m
26547	11-02039	OM-087	Royal Hospital	therapiert	Heterosexuelle Kontakte	48	m
26553	11-02204	OM-054	Awagad HC / Sala-lah	unbekannt	keine Angabe	24	w
26555	11-02206	OM-056	Sohar cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	23	w
26556	11-02207	OM-057	Sohar cdc	naiv	PPI	15	w

26557	11-02208	OM-058	Ibra cdc	unbekannt	keine Angabe	21	w
26536	11-02209	OM-059	AL Mawalec HC	unbekannt	keine Angabe	20	w
26559	11-02210	OM-060	Sohar cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	23	w
26564	11-02215	OM-065	Sohar cdc	unbekannt	keine Angabe	28	w
26566	11-02217	OM-067	Mabela HC	unbekannt	keine Angabe	28	w
26567	11-02218	OM-067	Sohar cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	45	w
26568	11-02219	OM-069	Ibri cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	30	w
26569	11-02220	OM-070	Rustaq cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	25	w
26546	11-02221	OM-071	Al Ghubra H/C	naiv	keine Angabe	26	w
26571	11-02222	OM-072	Ibri cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	29	w
26572	11-02223	OM-073	Sohar cdc	naiv	keine Angabe	32	w
26573	11-02224	OM-074	Sohar cdc	naiv	Heterosexuelle Kontakte	32	w
26574	11-02225	OM-075	Seeb H/C	naiv	Heterosexuelle Kontakte	30	w

Stammbäume:

PR/RT-Region



Pol-Region

