

Freie Universität Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

Etablierung einer subtypgenerischen HIV-1 envelope PCR zur Bestimmung des Korezeptor-Tropismus aus Plasma und dried fluid spots

Eingereicht
bei:

Prof. Dr. Norbert Bannert,
Prof. Dr. Rupert Mutzel

von:

Jennifer Ruffert

Ort/Datum:

Berlin, den 24.08.2018

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Geschichte	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Morphologie eines HIV Partikels	4
1.4	HIV Genom	5
1.5	Replikationszyklus	7
1.6	Glykoproteine	8
1.7	Zielstellung	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Technische Geräte	11
2.1.2	Chemikalien/Feinchemikalien/Reagenzien	11
2.1.3	Puffer	12
2.1.4	Kommerzielle Kits	12
2.1.5	Referenzen	13
2.1.6	Kunststoffverbrauchsmaterial	13
2.1.7	Patientenproben	14
2.1.8	Oligonukleotide/PCR- und Sequenzierungsprimer	15
2.1.9	Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	RNA-Extraktion	17
2.2.2	Env (1-3) cDNA Synthese	17
2.2.3	Env (1-3) Amplifikation – „SuperFI PCR“	19
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.5	Aufreinigung von DNA	23
2.2.6	Sanger-Sequenzierung	23
2.2.7	Next Generation Sequencing (NGS)	24
2.2.8	Korezeptor-Tropismus	26
2.2.9	Phylogenetische Analysen	26

3. Ergebnisse	27
3.1 Etablierung einer subtypgenerischen ENV PCR (Env1-3).....	27
3.1.1 <i>Full-length</i> envelope (Env-1, -2)	27
3.1.2 <i>V3-loop</i> Region (Env-3).....	29
3.2 Subtypenreferenzpanel	30
3.3 Subtypenverteilung des Patientenpanels.....	32
3.4 Bestimmung des Korezeptorgebrauchs.....	33
3.5 Phylogenetische Analyse des Patientenpanels	36
4. Diskussion	39
4.1 PCR Design	39
4.2 Sensitivität der etablierten PCRs	40
4.3 Subtypenreferenzpanel	42
4.4 Korezeptorgebrauch	42
4.5 Phylogenie	44
5. Zusammenfassung.....	46
6. Summary	47
7. Anhang.....	48
8. Danksagung	50
9. Literaturverzeichnis	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Übersicht zur Morphologie von HIV Partikeln.	2
Abb. 2 Evolutionsgeschichte der Lentiviren der Primaten.	4
Abb. 3 Morphologie eines HIV Partikels.	5
Abb. 4 Aufbau des HIV Genoms und Virions.	6
Abb. 5 Allgemeine Architektur eines löslichen, gespaltene, rekombinanten HIV-1 Env Trimer.	9
Abb. 6 Grafische Darstellung der Bereiche auf dem <i>env</i> -ORF für die „SuperFI-PCRs“.	20
Abb. 7 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten <i>full-length</i> envelope PCR (Env-1).	28
Abb. 8 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten <i>full-length</i> envelope PCR (Env-2).	28
Abb. 9 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten <i>V3-loop</i> Region PCR (Env-3).	29
Abb. 10 Erfolgsrate der durchgeführten PCRs für Plasma- (Env-1; -2) und DPS (Env-3).	30
Abb. 11 Agarose- Gelbild des Subtypenreferenzpanels mit PCR Produkten der etablierten <i>full-length</i> envelope PCR (Env-1).	31
Abb. 12 Agarose-Gelbild des Subtypenreferenzpanels mit PCR Produkten der etablierten <i>V3-loop</i> Region PCR (Env-3).	31
Abb. 13 Nachweisgrenzen für <i>full-length</i> (a) und <i>V3-loop</i> (b) PCR in Bezug auf das Subtypenreferenzpanel.	32
Abb. 14 Subtypenverteilung des Patientenpanels.	33
Abb. 15 Vorhersage für den Korezeptortropismus (R5, R5X4, X4) des Patientenpanels.	35
Abb. 16 Einfluss der Infektionsdauer auf den Korezeptorgebrauch (R5, R5X4, X4) der Viren.	36

Abb. 17 Vergleich der beiden phylogenetischen Bäume für das verwendete Patientenpanel.	37
Abb. 18 Vergleich der beiden phylogenetischen Bäume für das verwendete Patientenpanel mit compare2tree.	38

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht zu den ausgewählten Patientenproben.....	14
Tab. 2 Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden.....	16
Tab. 3 Mix für Denaturierung der Env (1,2) PCR	18
Tab. 4 Mastermix für Env (1,2) PCR	18
Tab. 5 Mix für Denaturierung der Env-3 PCR	19
Tab. 6 Mastermix für Env-3 PCR	19
Tab. 7 Mastermix für Env (1,2) PCR	21
Tab. 8 Mastermix für Env-3 PCR	21
Tab. 9 PCR Temperaturprofil für Env (1,2).	22
Tab. 10 PCR Temperaturprofil für Env-3.....	22
Tab. 11 PCR Temperaturprofil für die DPS.....	24
Tab. 12 Spezifität der <i>full-length</i> und <i>V3-loop</i> PCR.....	32
Tab. 13 Übersicht des Korezeptorgebrauchs für Env-1 und Env-3.....	34
Tab. 14 Übersichtstabelle der PCR Ergebnisse und des Korezeptorgebrauchs.....	48

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (erworbenes Immundefektsyndrom)
Bp	Basenpaare
CA	Capsid
CDC	Center for Disease Control
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CRF	Circulating Rekombinant Form
cpx	complex
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPS	Dried Serum Spots (getrocknete Seruntropfen)
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	Dithiothreitol
Env	Envelope
FPR	False Positive Rate (falsch-positiv Rate)
gag	Group-specific antigen
HIV	Humanes immundefizienz-Virus
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
INT	Integrase
kB	Kilobasen
Kop.	Kopien
LTR	Long Terminal Repeats
MA	Matrix
mRNA	Messenger RNA
MSM	Männer, die Sex mit Männern haben
n	Anzahl
nef	Negative regulatory factor
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Negativkontrolle
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pol	Polymerase

PK	Positivkontrolle
PR	Protease
rev	Regulator of expression of virion proteins
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNaseH	Ribonuclease H
RNasin	Ribonuclease Inhibitor (Ribonuklease Hemmer)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SBS	Sequencing by Synthesis
SIV	Simian immunodeficiency virus (Immundefizienzvirus der Affen)
SNP	single nucleotide polymorphism
SU	Surface Unit (Oberflächeneinheit)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
tat	Transactivator of transcription
UNAIDS	Joint United Nations Program on HIV/AIDS
URF	Unique recombinant form (einzigartige rekombinante Form)
vif	Viral infectivity factor
VLP	Virus-like particle (virusähnlicher Partikel)
vpr	Virales Protein r
vpu	Virales Protein u

1. Einleitung

1.1 Geschichte

1981 wurden sowohl in Kalifornien als auch in New York gehäuft homosexuelle Patienten mit dem Kaposi Sarkoma diagnostiziert (CDC 1981a). Das Kaposi Sarkoma wurde damals als seltener Gefäßtumor identifiziert, der sich u.a. in Form von Nekrosen auf der Haut des Betroffenen äußert. In Bezug auf AIDS steht diese Krebserkrankung heutzutage nachweislich mit dem latenten Humanen Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) im Zusammenhang (Mallery, S. 2004). Die Minderheit der Patienten wies außerdem schwere opportunistische Infektionen auf, beispielsweise Pneumocystis-Pneumonie, Toxoplasmose, Herpes-simplex oder Kandidose und starb innerhalb von vierundzwanzig Monaten (CDC 1981b).

Aufgrund der steigenden Prävalenz, proklamierte das Center for Disease Control (CDC) die erste Fall Definition für AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) im darauffolgenden Jahr (CDC 1982). 1983 entdeckten Luc Antoine Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi den Auslöser dieser erworbenen Immundefizienz, indem sie erstmals den Erreger des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) aus Blutproben AIDS erkrankter Patienten isolierten und beschrieben. Anfänglich wurde das Retrovirus als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) oder humanes T-lymphotropes Virus 3 (HTLV-III) bezeichnet (CDC 1981b, Montagnier, L. 2002). 1986 wurde HIV-2 isoliert (Abb.1) und ebenfalls als Auslöser des erworbenen Immundefizienz Syndroms identifiziert (Clavel, F. et al 1986).

Die AIDS Pandemie ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine virale Zooanthroponose in Zentral Afrika zurückzuführen. Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass der Ursprung der beiden HIV Typen in der Ordnung der Primaten liegt (Sharp, P. 1995). HIV-1 ist nah verwandt mit dem simianen Immundefizienz-Virus von Schimpansen (SIV_{cpz}), die aus Teilen West und Zentral Afrikas stammen. Im Gegensatz dazu ist HIV-2 näher verwandt mit dem SIV von Rußmangaben (SIV_{cm}) westafrikanischer Herkunft (Gao, F. et al. 1992, 1999).

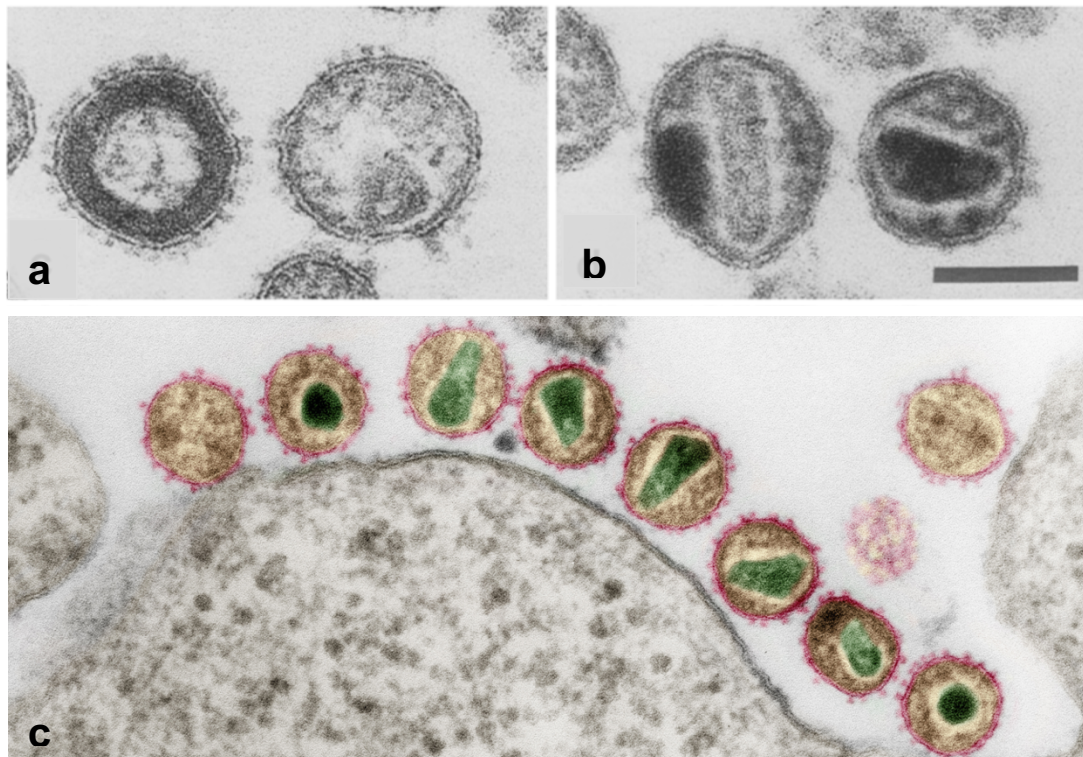


Abb. 1 Übersicht zur Morphologie von HIV Partikeln.

a) unreifes (rechts) sowie morphologisch reifes (links) HIV-2, b) reifes HIV-1 Virion mit zwei möglichen Kernformen. Kegelförmiger innerer Körper (rechts) und röhrenförmiger Kern (links). c) kolorierte HIV-1 Partikel (Quelle: Hans R. Gelderblom, Kolorierung: Andrea Schnartendorff/RKI).

1.2 Epidemiologie

Unabhängige artübergreifende Übertragungsereignisse nichtmenschlicher Primaten auf den Menschen führten im Laufe der Zeit wahrscheinlich zu den verschiedenen HIV Abstammungslinien, die heute noch z.B. durch direkte Infektionen evolvieren (Abb. 2). In Deutschland infizieren sich Patienten am häufigsten mit dem Subtyp B der Untergruppe M (*main*) des HIV-1. Diese Untergruppe ist verantwortlich für die weltweite HIV Pandemie und umfasst insgesamt 9 verschiedene Subtypen, die mit A, B, C, D, F, G, H, J und K bezeichnet werden. Weitere seltenere Untergruppen von HIV-1 sind N (*non-M, non-O*), O (*outlier*) und P (*pending*, Plantier, J.-C. et al. 2009). Sowohl Gruppe N als auch Gruppe P konnten in Patienten aus Kamerun nachgewiesen werden. Gruppe O wird häufig in West-Zentral Afrika gefunden. Zudem kombinieren sich verschiedene Subtypen, z.B. durch Ko-Infektionen, zu einem Mosaik-Virus, der sogenannten *circulating recombinant form* (CRFs). Von diesen sind vor allem CRF01_AE und CRF02_AG weit verbreitet (Buonaguro, L. et al, 2007).

HIV-2 ist in die Gruppen A-H zu klassifizieren und es existiert bisher nur eine CRF (Hemelaar, J. 2012).

Schätzungen der UNAIDS zufolge lebten 2016 weltweit insgesamt 36,7 Millionen (95 % KI: 30,8 – 42,9) Menschen mit HIV. Ost und Süd Afrika gehören zu den am stärksten betroffenen Regionen der Erde. Allerdings verdoppelte sich in diesem Gebiet seit 2010 die Anzahl, der mit antiretroviraler Medizin behandelten Patienten und erreichte insgesamt 10,3 Millionen Menschen. Des Weiteren verringerte sich die Anzahl der tödlich verlaufenden Krankheitsfälle um 36 % seit 2010 (Global Aids Update, UNAIDS Mai 2016).

In Deutschland wurden Ende 2016 insgesamt 88.400 HIV Infizierte registriert, davon standen 64.900 Patienten bereits unter antiretroviraler Therapie (ART). Das Robert Koch-Institut schätzt 3.100 (95 % KI: 2.900–3.200) neue Infektionen in 2016, darunter 2.100 (67,7 %) aus der Risikogruppe Männer, die Sex mit Männern haben (MSM). Allerdings verbleibt die Zahl der Neuinfektionen im zeitlichen Verlauf weitestgehend stabil, der Anteil an unter Therapie stehenden Patienten steigt stetig an (Epidemiologisches Bulletin, Nov.2017/Nr. 47, Robert Koch-Institut).

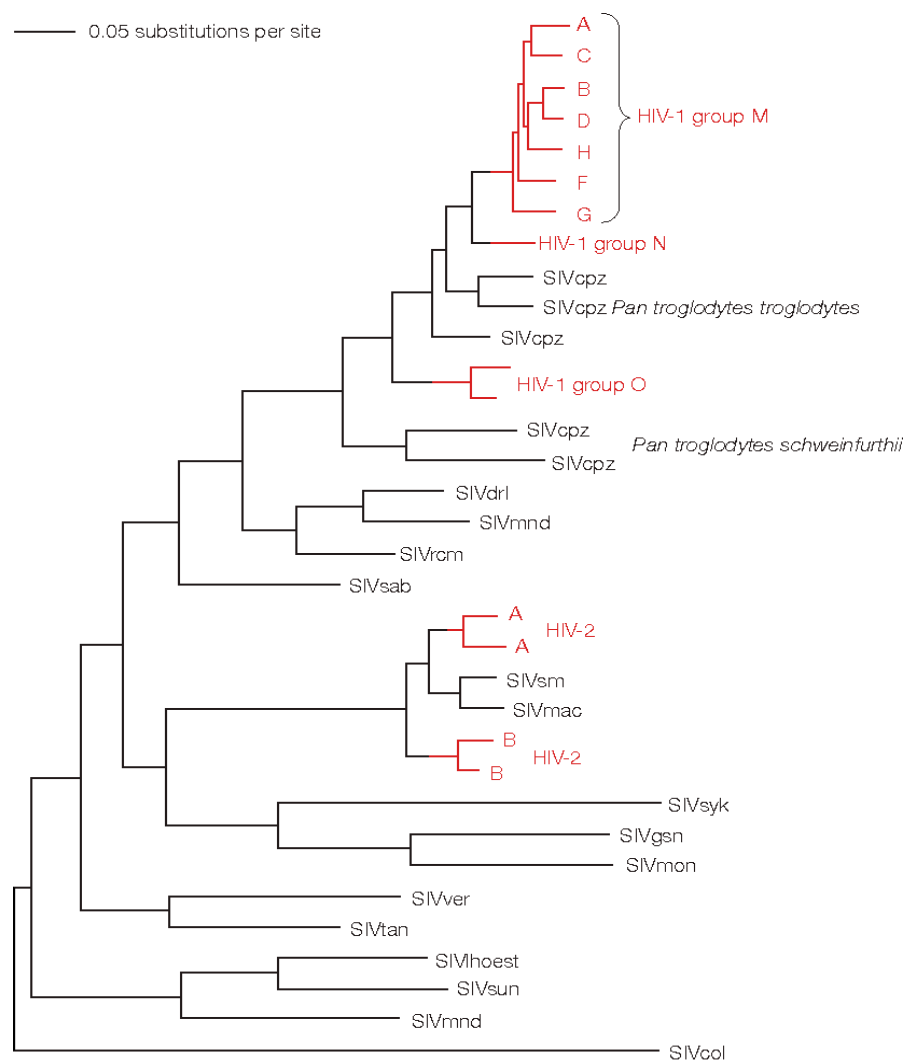


Abb. 2 Evolutionsgeschichte der Lentiviren der Primaten.

HIV-1 (schwarze Linien) und HIV-2 (rote Linien) repräsentieren das Ergebnis der Evolution des SIV durch z.T. artübergreifende Übertragungsereignisse. Es werden nur einige HIV-1 und HIV-2 Subtypen gezeigt. SIVcol, Schwarz-weißen Stummelaffen; SIVdr1, Drill; SIVgsn, Große Weißnasenmeerkatze; SIVhoest, Östliche Vollbartmeerkatze; SIVmac, Makak; SIVmnd, Mandrill; SIVmon, Campbell-Meerkatze; SIVrcm, Bolivianischer Totenkopffaffe; SIVsab, Gelbgrüne Meerkatze; SIVsun, Sonnenschwanzmeerkatze; SIVsyk, Weißkehlmeerkatze; SIVtan, Tantalus-Grünmeerkatze; SIVver, Vervetmeerkatze (Quelle: Rambaut, A. et al. 2004)

1.3 Morphologie eines HIV Partikels

HIV ist dem Genus der Lentiviren zuzuordnen und damit Teil der Familie der Retroviren (UNAIDS Terminology and Guidelines, UNAIDS 2015). Laut des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) werden für Lentiviren 9 verschiedene Serotypen kategorisiert, je nachdem mit welchem Vertebraten sie assoziiert werden. Wie bereits erwähnt, gehört HIV zu den Lentiviren der Primaten und zeichnet sich u.a. durch den Gebrauch des CD4 Proteins als Oberflächenrezeptor aus (Piguet, V. 1999). Ein HIV

Virion (Abb.3) ist annähernd sphärisch mit einem Durchmesser von 80-110 nm und wird von einer Doppellipidmembran umhüllt, die einen kovalent gebundenen Env-Glykoproteinkomplex gp160 einbettet. Dieser sogenannte heterodimere *spike* besteht aus einem Trimer-Transmembran-Glykoprotein gp41 und einem externen Trimer-Oberflächen-Glykoprotein gp120. Die Interaktion zwischen der gp120 Region sowie der gp41 Ektodomäne ist essentiell für die Bindung des viralen Rezeptors an die Zielzelle. An der Innenseite der Virushülle heftet sich das Matrixprotein p17 an. Das aus zwei identischen RNA-Kopien bestehende virale Genom, wird von einem konischen Kapsid umschlossen (Gelderblom et al. 1989). Die lineare Einzelstrang-RNA bindet t-RNA aus der Wirtszelle. Das 3' Ende ist polyadenyliert und das 5' Ende trägt einen Cap (Coffin, J. 1997).

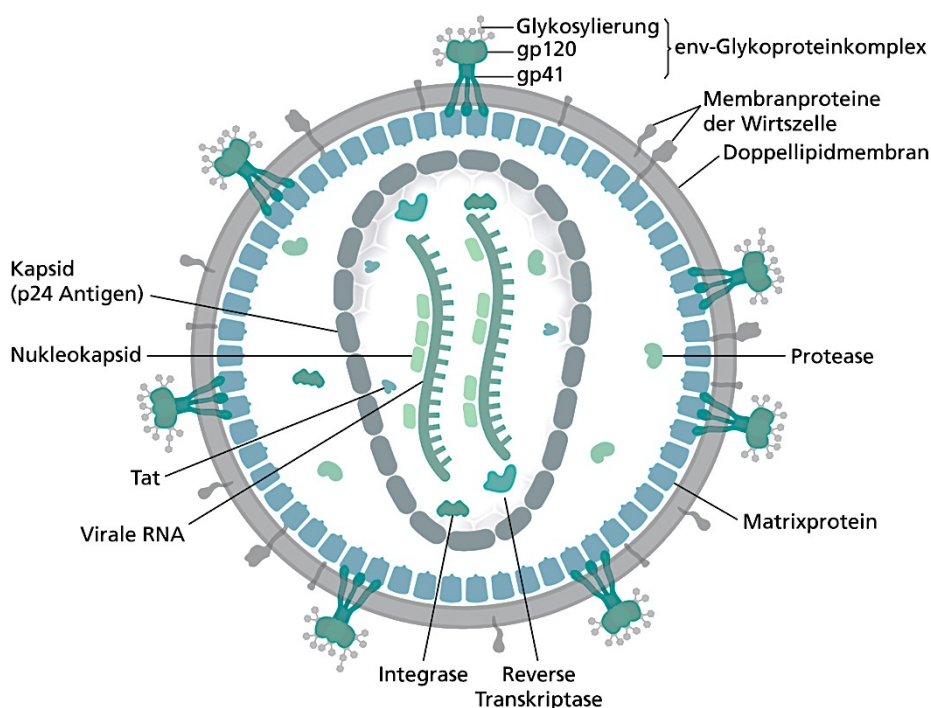


Abb. 3 Morphologie eines HIV Partikels.
(Quelle: Dr. Thomas Splettstößer)

1.4 HIV Genom

Ein RNA-Monomer des HIV-1 ist ca. 9 – 10 kBp groß und besteht aus den für Retroviren typischen drei großen offenen Leserahmen (open reading frames, ORF, Abb.4), die als *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope glycoprotein*) bezeichnet werden. Die genannten Polyproteine werden anschließend in die für Retroviren spezifischen individuellen Proteine proteolysiert. Wie bereits erwähnt kodiert *env* zum einen für das Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU) und zum anderen für das

Transmembran-Glykoprotein gp41 (TM). Gag umfasst das Matrixprotein (MA) p17, das Kapsidprotein (CA) p24, das Nukleokapsid (NC) und p6. Die drei Pol Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (INT) sind ebenfalls innerhalb des Partikels eingebettet. Außerdem kodiert HIV-1 sowohl für 2 essentielle regulatorische (*Tat*, *Rev*) als auch für 4 akzessorische regulatorische Proteine (*Vpr*, *Vif*, *Nef*, *Vpu*, Frankel, A. D. & Young, J. A. 1998). Das virale Genom wird überdies von zwei nicht kodierenden LTR-Regionen (*long terminal repeat*) flankiert, die als Kontrollcenter der Genexpression und der Integration des HIV-1 in die Wirtszelle agieren. Dabei wird die Transkription von dem 5'LTR initiiert, während das LTR am 3' Ende die naszierende virale RNA Polyadenylierung unterstützt sowie für das akzessorische Protein Nef kodiert (Malani, P. 2016, Klaver, B et al. 1994).

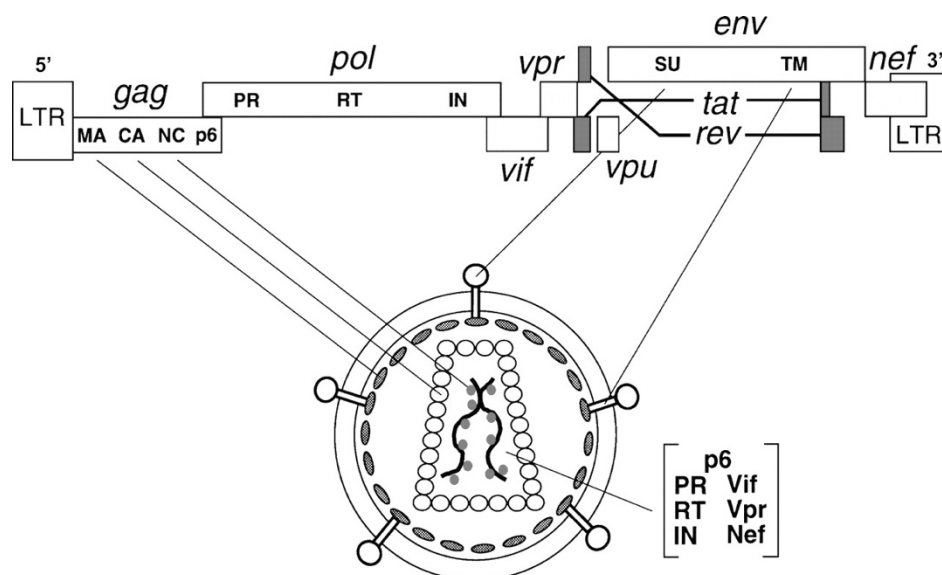


Abb. 4 Aufbau des HIV Genoms und Virions.
(Quelle: Frankel, A. D. & Young, J. A. 1998)

1.5 Replikationszyklus

Das Humane Immundefizienz-Virus kann über Schleimhäute, ekzematöse oder verletzte Haut bzw. parentale Inokulation in den Körper eindringen. Dabei infiziert es dendritische Langerhans' Zellen, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (Gendelman, H.E. et al. 1989; Balasubramaniam, M. & Freed, E.O. 2011). Die HIV-1 Replikation schreitet immer in der gleichen chronologischen Reihenfolge fort und beginnt mit der Fusion des gp120 an den Glykoprotein-Rezeptor CD4 (*attachment*). Für die spezifische *in vivo* Bindung des Virus an CD4+ Zellen sind, im Falle von HIV-1, die beiden Chemokin- oder Korezeptoren CCR5 und CXCR4 essentiell. Abhängig davon an welchen Korezeptor der Virus bindet, wird der HIV-Stamm als CCR5-trop (R5 Virus) bzw. Makrophagen-trop (M-trop) oder CXCR4-trop (X4 Virus) bzw. T-Zellen-trop (T-trop) bezeichnet (Freed, E. 2001, Bour, S. et al, 1995).

Nach erfolgter Rezeptorfusion erfährt sowohl gp120 als auch gp41 eine Konformationsveränderung. Dieser veränderte gp120/gp41 Env Glykoprotein Komplex ermöglicht die Interaktion zwischen dem V3-*loop* des gp120 und dem Korezeptor der CD4+ Zelle. Daraufhin erfolgt die Verschmelzung der Doppellipidschicht der viralen Hülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle. Das Kapsid des Viruspartikels wird in das Cytoplasma entlassen und die zwei Einzelstrang-RNA können freigesetzt werden (*uncoating*). Die vorhandene genomische RNA wird mit Hilfe der RT durch Reverse Transkription in eine provirale cDNA umgeschrieben (Frankel, A. D. & Young, J. A. 1998). Allerdings besitzt die RT keine *proofreading* Funktion und unterliegt einer durchschnittlichen Fehlerrate von 1/1700 pro einbauten Nukleotid (Roberts, J. et al 1988). Dieses mutagene Umfeld führt einerseits zu replikations-inkompetenten, andererseits zu einer Vielzahl nah miteinander verwandter Virusvarianten, die sich z.T. nur durch eine Mutation voneinander unterscheiden. Diese Virusvarianten innerhalb eines Patienten bezeichnet man als Quasispezies. Aufgrund der hohen Mutationsrate, kann es unter Therapie, bei der die Wirkstoffspiegel nicht ausreichend hoch sind, zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber antiretroviralen Medikamenten kommen (Freed, E. 2001, Temin, H. M. 1993).

Schließlich wird die provirale DNA als Teil eines Präintegrationskomplexes zum Nukleus der Wirtszelle transportiert. Das Protein Int katalysiert die Integration der genetischen Information in das Wirtszellenchromosom (Coffin, J. et al. 1997). Der integrierte Provirus fungiert somit als Vorlage für die Synthese der viralen RNA, die durch die wirtszelleigene RNA Polymerase II von der DNA transkribiert wird (Herschhorn, A. et al. 2010). Zuerst werden die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef von kurzer, mehrfach gespleißter

mRNA codiert. Rev initiiert den Transport einfach gespleißter (Env, Vif, Vpr, Vpu) und ungespleißter (Gag, Gag-Pol) Transkriptionsprodukte aus dem Nukleus ins Cytoplasma in Richtung der Zelloberfläche. Das Env Heterodimer gp120/gp41 wird am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und bildet das Env Präkursor-Protein gp160. Nach der Selbstorganisation (*self assembly*), die auf die Expressierung von Gag zurückzuführen ist, akkumulieren sich HIV RNA, Env- und Gag-Proteine an der Zellmembran (Campbell, S. & Vogt, V.M. 1995). Während der Knospung (*budding*) vereinen sich die viralen Proteine zu einer neuen Generation an unreifen Virus ähnlichen Partikeln (VLPs), die sich schließlich von der Wirtszelle ablösen. Im Prozess der Reifung führt die Proteolyse von Gag und Pol durch die virale PR zu dem infektiösen Viruspartikel (Bieniasz, P. 2006, Usami, Y. 2009).

1.6 Glykoproteine

Das Env Trimer ist ein wesentlicher Bestandteil für die Übertragung sowie Pathogenität des HIV-1 (Abb.5). Wie bereits erwähnt besteht es aus gp120/gp41 Heterodimeren, die zusammen einen Glykoproteinkomplex gp160 bilden. Während der Env Synthese werden die Heterodimere von der zellulären Furin-Protease in ihre Untereinheiten gp120 und gp41 gespalten, die nun durch nicht-kovalente Bindungen miteinander assoziiert sind (Julien, J.-P. et al. 2013; Lu, M. 1995). Innerhalb von gp120 existieren fünf variable Regionen (V1-V5), von denen die ersten vier aufgrund von intramolekularen Disulfidbindungen als große, schleifenartige Strukturen (*loops*) erscheinen (Leonard, C. et al 1990). Die variablen Regionen V1, V2 und V3 zeigen die größte Variabilität innerhalb der Protomere. Die V3-Domäne umfasst ein hochkonserviertes Motiv aus vier Aminosäuren (GPGR-Motiv) ist für die Bindung an den CD4-Rezeptor und den Korezeptor der Zielzelle verantwortlich.

Jedes Protomer enthält ca. 27 N-gekoppelte Glykosylierungsstellen, somit ist HIV-1 Env als ein hoch glykosyliertes Protein einzuschätzen. Während einer Infektion ist das Env Trimer das Hauptziel für neutralisierende Antikörper. Die Variabilität und Glykosylierung begünstigt die Immuno- sowie Antigenität des gp120 Glykoproteins und umgeht somit die humorale Immunantwort des Organismus (Moulard, M. & Decroly, E. 2000; Wyatt, R. & Sodroski, J. 1998).

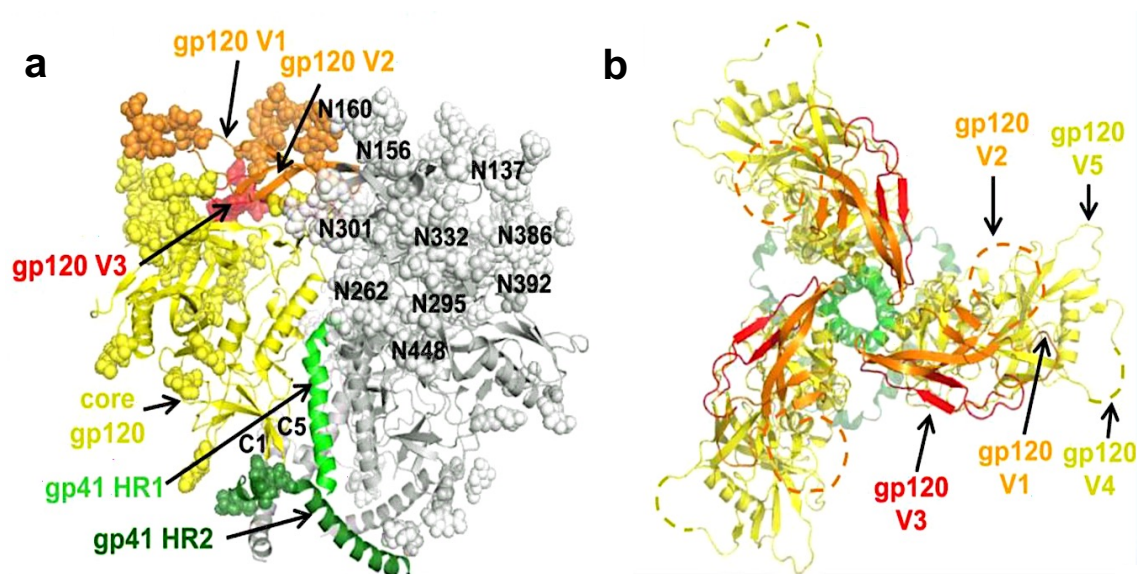


Abb. 5 Allgemeine Architektur eines löslichen, gespaltenen, rekombinanten HIV-1 Env Trimer.
 a) Seitenansicht eines Env Trimer. Ausschnitt eines der drei Promotoren mit gp120 (gelb), V1/V2 und V3 Regionen (orange bzw. rot) und gp41 (grün). N-linked Glykane (grau) sind in Bezug auf ihre Asn-Rest nummeriert. b) Vogelperspektive des Env Trimer ohne Glykosylierungsstellen. Gestrichelte Linien deuten die Position des gp120 V2 und V4 loops an. (Quelle: Julien, J.-P. et al. 2013)

1.7 Zielstellung

Die Glykoproteine sind für die Übertragung von HIV-1 essentiell. Gp120 bindet an den CD4- und an einen Chemokinrezeptor der entsprechenden Zielzelle. Der V3-loop, innerhalb von gp120, unterstützt die Bindung an den CCR5 oder CXCR4 Korezeptor. Gp41 ist für die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran verantwortlich und erlaubt damit den Eintritt des viralen Genoms in die Zielzelle. Beide Proteine fungieren auch als Strukturelement und bilden die Virushülle des Virions. Der Env *spike* auf der Oberfläche des Virions ist außerdem die einzige Virus-spezifische Komponente, die potentiell für neutralisierende Antikörper erreichbar ist. Aufgrund dieser wichtigen Funktionen innerhalb des HIV Lebenszyklus, sind Glykoproteine ein interessanter Ansatzpunkt der antiretroviralen Therapie (Caffrey, M. 2001). Zur Behandlung einer HIV Infektion wurden daher z.B. Fusionsinhibitoren entwickelt. Maraviroc ist ein antiretrovirales Medikament, das die Bindung von HIV-1 an den Chemokinrezeptor CCR5 verhindert, während Fostemsavir den gp120 Korezeptor des HIV besetzt und somit die Bindung des Virus an die Wirtszelle inhibiert. Fusionsinhibitoren repräsentieren eine neue Klasse der Korezeptor Antagonisten, die die initiale Interaktion zwischen M- bzw. T-tropen Viren und der Zielzelle unterbinden (Nettles, R. E. et al. 2012). Eine Voraussetzung für die Entwicklung weiterer antiretroviraler Medikamente dieser Art stellt

die Erforschung des Korezeptor-Tropismus dar. Daher ist das Ziel dieser Arbeit zum einen die Etablierung einer subtypgenerischen *full-length* envelope PCR für die Serokonverterstudie des Robert Koch-Instituts. Dafür wird das *env*-ORF mit den entsprechenden Monomeren gp120 und gp41 von viralen RNA aus humanem Plasma sequenziert.

Als zweites Ziel soll eine hochsensitive PCR etabliert werden, um aus Material der Molekularen HIV Surveillance die *V3-loop* Region zu amplifizieren, um den Korezeptor-Tropismus innerhalb dieser zu bestimmen. Problematisch hierbei ist, dass das Patientenmaterial filtergetrocknetes Serum/Plasma ist (Dried Serum/Plasma Spots, DSS/DPS). Des Weiteren enthält sie im Gegensatz zu bisherigen PCR-Setups eine *proofreading* Funktion und unterstützt die routinemäßige Untersuchung von Material der Molekularen Surveillance. Des Weiteren sollen die sequenzierten Fragmente der beiden PCR-Setups phylogenetisch miteinander verglichen werden. Die Gegenüberstellung der Stammbäume soll zeigen, welche Fragmentlänge (500 Bp oder 3200 Bp) für phylogenetische Analysen besser geeignet ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Extraktor	NucliSens easyMAG, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer	Horizon [®] 58 Gibco BRL, Eggstein, Deutschland
Kapillarelektrophorese Sanger	ABI 3130 genetic analyzer, Foster City, USA
Kapillarelektrophorese NGS	Agilent Bioanalyzer, Santa Clara, USA
Lunimometer	TECAN Infinite [®] 200 PRO, Männedorf, Schweiz
Hereaus Multifuge X3FR Zentrifuge	Fresco 21, ThermoFisher Scientific, USA
Präzisionswaage	L610D, Satorius, Elk Grove Village, USA
Sicherheitswerkbank	Bleymehl Reinraumtechnik, Inden-Pier, Deutschland
Thermozykler	Mastercycler proS, Eppendorf AG, Hamburg; T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen

2.1.2 Chemikalien/Feinchemikalien/Reagenzien

Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
AmpureXP Beads	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
dNTP Mix	Thermo Scientific, Lithuania

Ethanol 80 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, OH, USA
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Magnetic Beads	MagSil
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Puffer

6x Ladepuffer	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
50x TAE-Puffer	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
1x TE-Puffer	Promega, Madison, USA
Lysis Buffer	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland

2.1.4 Kommerzielle Kits

BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
RNasin	Promega, Madison, USA
Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit	Illumina
Platinum SuperFi DNA Polymerase	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Superscript® III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA

2.1.5 Referenzen

Positivkontrolle	HIV-Laborstamm HTLVIIIB (1x 10 ⁶ Kopien/mL)
Negativkontrolle	HIV-negatives Plasma, VE H ₂ O
Subtypenpanel 1	A Nr. 2
Subtypenpanel 2	B Nr. 4
Subtypenpanel 3	C Nr. 15
Subtypenpanel 4	D Nr. 1
Subtypenpanel 5	F Nr. 10
Subtypenpanel 6	G Nr. 12
Subtypenpanel 7	AG 00-0200
Subtypenpanel 8	AE Nr. 26

2.1.6 Kunststoffverbrauchsmaterial

Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film	BioRad, München, Deutschland
Mikropipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Rapidozym, Luckenwalde, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Lochplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.7 Patientenproben

Bei den verwendeten Proben handelt es sich um Plasma HIV-infizierter Patienten aus Deutschland. Je 200 µl Plasma wurde auf Filter getropft (*dried plasma spots*, DPS) und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert.

Nach der Etablierungsphase wurden die Plasmaproben für die PCR Env-1 und Env-2 verwendet und mithilfe von NGS untersucht. Die Filterproben wurden für die PCR Env-3 benutzt und Sanger sequenziert.

Tab. 1 Übersicht zu den ausgewählten Patientenproben.

Scount	Subtyp	Risiko	First HIV_{Pos}	Mat Datum_{Calc}
03-00170	B	Homo-/bisexuell	2002-04-12	2003-06-12
03-00253	B	Homo-/bisexuell	2002-05-00	2003-09-16
04-00462	B	Homo-/bisexuell	2003-05-14	2004-09-17
05-00605	URF	Homo-/bisexuell	2005-04-06	2005-06-07
05-01219	B	Homo-/bisexuell	2004-04-01	2005-12-20
06-00038	B	Homo-/bisexuell	2005-07-03	2006-01-26
06-00060	B	Heterosexuelle Kontakte	2004-01-15	2006-02-14
06-00184	B	Homo-/bisexuell	2005-01-25	2006-04-25
06-00279	B	Homo-/bisexuell	2005-05-11	2006-05-16
06-00366	B	Homo-/bisexuell	2005-02-03	2006-05-26
06-00677	B	Homo-/bisexuell	2005-02-21	2006-08-07
06-00842	B	Homo-/bisexuell	2005-04-12	2006-09-28
07-00229	B	Homo-/bisexuell	2004-02-20	2007-03-07
07-00251	B	Homo-/bisexuell	2006-02-02	2007-03-15
07-00609	B	Homo-/bisexuell	2006-11-30	2007-07-11
07-00838	B	Homo-/bisexuell	2006-06-09	2007-09-06
07-00868	B	Heterosexuelle Kontakte	2005-02-04	2007-09-18
07-01095	B	Homo-/bisexuell	2006-09-19	2007-11-15
07-01180	B	Homo-/bisexuell	2006-05-03	2007-12-13
08-00282	CRF11_cpx	Endemiegebiet	2007-09-00	2008-01-30
08-00425	B	Heterosexuelle Kontakte	2007-01-23	2008-03-17
08-03401	B	Heterosexuelle Kontakte	2006-06-02	2008-11-04
08-03488	B	Homo-/bisexuell	2008-11-06	2008-11-06
08-03658	B	Homo-/bisexuell	2007-03-29	2008-11-24
08-04005	B	Homo-/bisexuell	2007-12-04	2008-12-11

Scount	Subtyp	Risiko	First HIV_{Pos}	Mat Datum_{Calc}
09-00977	B	Homo-/bisexuell	2008-04-01	2009-03-10
09-02886	B	Homo-/bisexuell	2008-01-30	2009-08-25
09-03252	B	Homo-/bisexuell	2008-02-20	2009-09-11
10-01532	B	Homo-/bisexuell	2009-03-24	2010-04-22
11-00697	B	Homo-/bisexuell	2008-02-06	2011-02-28
11-03050	B	Homo-/bisexuell	2010-08-04	2011-08-16
11-03356	CRF13_cpx	Heterosexuelle Kontakte	2011-08-16	2011-09-09
11-03459	CRF18_cpx	Heterosexuelle Kontakte	2011-09-16	2011-09-16
12-01693	G	Heterosexuelle Kontakte	2012-05-14	2012-05-14
12-04096	B	-	2008-07-15	2012-11-13
13-00107	D	Homo-/bisexuell	2012-10-12	2013-01-09
14-00227	C	Homo-/bisexuell	2014-01-09	2014-01-20
14-01568	A1	Heterosexuelle Kontakte	2014-03-28	2014-04-14
14-03090	F2	Heterosexuelle Kontakte	2015-09-03	2014-08-15
14-03658	CRF01_AE	Homo-/bisexuell	2014-09-30	2014-09-30
15-01671	F1	Heterosexuelle Kontakte	2015-05-18	2015-05-19
16-00815	CRF20_BG	Homo-/bisexuell	2016-02-25	2016-02-25
17-02270	CRF02_AG	Homo-/bisexuell	2017-06-07	2017-06-29
17-02984	CRF35_AD	Homo-/bisexuell	-	2017-08-22

2.1.8 Oligonukleotide/PCR- und Sequenzierungsprimer

Für die Amplifikation sowie Sequenzierung der gewählten Fragmente wurden verschiedene Primerkombinationen ausprobiert und verwendet. Bei der Etablierung einer geeigneten PCR wurde der gesamte *env*-ORF (Env-1, 3200 Bp), ein Teilabschnitt des *env*-ORFs (Env-2, 1600 Bp) und ein kleines Fragment, dass den V3-loop enthält (Env-3, 500 Bp) amplifiziert und sequenziert. Die Primer und deren Kombinationen untereinander wurden zuerst mithilfe der Geneious[®] Software ausgewertet und anschließend mit dem laboreigenen HTLVIIIB Stamm (HIV-1 Subtyp B, 10^1 - 10^6 Kopien/mL) getestet (Tab. 1).

Tab. 2 Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden

Primer	Verwendung	Sequenz 5' 3'	Lokalisation auf HXB2*
FL_15_5965_SF_fw	Env-1	YTMCTATGGCAGGAAGAAGC	5965-5984
FL_16_5967_AG_fw	HTLVIIIB	CCTATGGCAGGAAGAAGCG	5967-5985
FL_18_7800_SF_fw	HTLVIIIB	GCMGGAAGCACTATGGGC	7800-7817
FL_22_9630_SF_rv	Env-1; -2	ACTCAAGGCAAGCTTTATTG	9611-9630
FL_23_9167_SF_rv	Env-1	CAATCWGGGAAGWAKCCTTG	9148-9167
FL_24_6952_SF_fw	Env-2; -3	GCWCAGTACAATGYACACATGG	6952-6973
FL_25_7541_SF_rv	Env-3	RATGGGAGGRGCATAYATTGC	7521-7541
FL_26_6436_SF_fw	HTLVIIIB	CACATGCCTGTGTACCCAC	8344-8365
FL_27_8365_SF_rv	Env-2	GGTGAGTATCCCTGCCTAACTC	5965-5984
6537s_ok	HTLVIIIB	AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC	6945-6969
2as_ok	HTLVIIIB	AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA	7351-7374

*HXB2 Accession Number K03455

2.1.9 Software

Compare2Trees	Newcastle upon Tyne, England
E.A.S.Y Win 32	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Geneious 10.0.5	Biomatters, Auckland, Neuseeland
IQ-Tree 1.6.6	IQ-Tree Development Team, Wien, Österreich
Magellan	Tecan, Männedorf, Schweiz
NCBI Primer-Blast Tool	NCBI, MD, USA
R Software Package	R Core Team, Auckland, Neuseeland
REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0	Stanford Universität, Kalifornien, USA

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem bioMérieux Extraktionssystem NucliSENS® miniMAG®. Dazu wurde Plasma sowie filtergetrocknetes Plasma verwendet. Zusätzlich zu den Patientenproben diente HTLVIIIB (10^6 Kop./mL) als Positivkontrolle und HIV-negatives Plasma als Negativkontrolle.

Für die Extraktion aus DPS wurden je 2 Filter einer Probe in Reaktionsgefäßen (2 mL) gelagert und mit 1,5 mL Lysispuffer versetzt. Nachdem der Ansatz für 1 h bei 800 rpm, 37 °C inkubiert wurde, wurden ca. 1,2 mL Lysispuffer Überstand abgenommen und in bioMérieux- Einwegbehälter pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL magnetic Beads.

Von den Plasma Proben wurden zur Kryopräzipitatentfernung jeweils 600 µL Plasma aliquotiert und bei 3000 x g 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 2 mL Lysispuffer in einem bioMérieux- Einwegbehälter vorgelegt. Im Anschluss an die Kryopräzipitation wurden 450 µL des Überstands abgenommen, zum Lysispuffer pipettiert und gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µL magnetic Beads pro Probe hinzugegeben und mittels automatischer Pipette gemischt.

Die vorbereiteten Proben wurden anschließend in das NucliSENS easyMAG System eingebunden. Innerhalb des Geräts werden alle Nukleinsäuren an magnetische Silikapartikel gebunden und diese wiederum an die NucliSENS easyMAG Magnete. Die Extraktion der viralen RNA erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Die RNA wurde in 60 µL Puffer eluiert und anschließend in einem Kühlblock gelagert (0-4 °C). Die Aliquots wurden zu je 10 µL in vorgekühlte Reaktionsgefäße (0,2 mL) portioniert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Env (1-3) cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 10 µL der extrahierten RNA mit einem Denaturierungs-Mix aus einem spezifischen Primer und dNTP versehen, mit Wasser aufgefüllt und bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert.

Tab. 3 Mix für Denaturierung der Env (1,2) PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Volumen
Nuklease-freies H ₂ O		2,25 µL
dNTP	10 mM	1 µL
Primer FL_22_9630_SF_rv	2 µM	1 µL
		Σ 4,25 µL

Nachfolgend wurde dem gesamten Mix aus der Denaturierung (14,25 µL) ein RT-Mastermix zugegeben und für 1½ h bei 50 °C und danach für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Tab. 4 Mastermix für Env (1,2) PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Volumen
5x SSIII Buffer	5x	4 µL
DTT	0,1 M	1 µL
RNasin		0,25 µL
SuperScript III	200 U/µL	0,5 µL
		5,75 µL RT-Mix
		+ 14,25 µL RNA/Primer Mix
		Σ 20 µL

Im Anschluss erfolgte zur Entfernung des RNA-Templates die Zugabe von 1 µL RNaseH (Superscript® III First-Strand Synthesis System, Invitrogen) je Probe. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde zwischen -30 bis -10 °C gelagert.

Die cDNA Synthese für die ENV-3 PCR wurde mit Random Hexamer Primern wie folgt durchgeführt.

Tab. 5 Mix für Denaturierung der Env-3 PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Volumen
Nuklease-freies H ₂ O		2,25 µL
dNTP	10 mM	2,25
Primer_R6	50 µM	1
		Σ 4,25 µL

Dem gesamten Mix aus der Denaturierung (14,25 µL) wurde ebenfalls ein Mastermix zugegeben und zuerst für 5 Minuten bei 25 °C, dann für 50 Minuten bei 50 °C inkubiert und als letzten Schritt für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

Tab. 6 Mastermix für Env-3 PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Volumen
5x SSIII Buffer	5x	4 µL
DTT	0,1 M	1 µL
RNasin		0,25 µL
SuperScript III	200 U/µL	0,5 µL
		5,75 µL RT-Mix
		+ 14,25 µL RNA/Primer Mix
		Σ 20 µL

2.2.3 Env (1-3) Amplifikation – „SuperFI PCR“

Um die DNA der Proben zu vervielfältigen, wurde eine PCR durchgeführt (*Polymerase Chain Reaction*). Die Amplifikation erfolgt exponentiell und beruht auf der Grundlage zyklischer Wiederholungen der Replikation eines DNA-Fragments. Die Erstellung eines spezifischen Master Mix (Tab. 5, 6) ist Voraussetzung hierfür. In der Abbildung 6 ist eine

Übersicht der Fragmente innerhalb des *env*-ORFs zu erkennen, die durch die PCR amplifiziert und danach sequenziert wurden.

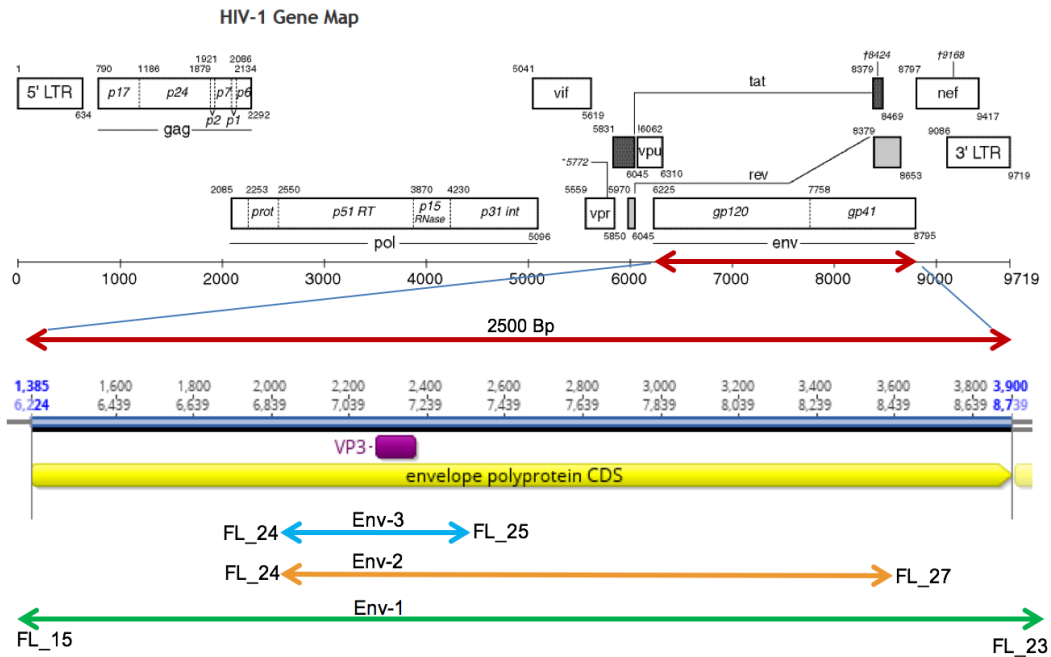


Abb. 6 Grafische Darstellung der Bereiche auf dem *env*-ORF für die „SuperFI-PCRs“.

Das HXB2 Genom dient als Referenz. Die einzelnen Fragmente sind mit Env 1-3 bezeichnet und in unterschiedlichen Farben markiert (grün, orange, blau). In violett ist die V3 loop-Region markiert. Die flankierenden Primerpaare entsprechen den Primer für die jeweilige PCR. Die jeweilige Länge der Fragmente beträgt: Env-1: 3200 Bp, Env-2: 1600 Bp und Env -3: 500 Bp (Quelle: HIV sequence database, bearbeitet)

Tab. 7 Mastermix für Env (1,2) PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Konz. final	Volumen
Nuklease-freies H ₂ O			7,5 µL
Reverse Primer	10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Forward Primer	10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Platinum SuperFI PCR Master Mix	2x	1x	12,5 µL
			22,5 µL RT-Mix + 2,5 µL cDNA FL_22
			∑ 25 µL

Tab. 8 Mastermix für Env-3 PCR

Reagenz	Konz. Stocklösung	Konz. final	Volumen
Nuklease-freies H ₂ O			7,5 µL
Reverse Primer	10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Forward Primer	10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Platinum SuperFI PCR Master Mix	2x	1x	12,5 µL
			22,5 µL RT-Mix + 2,5 µL cDNA R6
			∑ 25 µL

Bei der Denaturierung wird die Reaktionslösung auf 98 °C erhitzt und somit in Einzelstränge aufgetrennt. Das Primer-Annealing erfolgt unter einer Primer-spezifischen Temperatur (Tab. 7, 8) und ermöglicht die Bindung der Oligonukleotide an die komplementäre RNA. Dort setzt die Polymerase an und füllt den Einzelstrang mit

Nukleotiden auf. Die Erhöhung der Temperatur auf 72 °C führt schließlich zur Elongation der DNA.

Tab. 9 PCR Temperaturprofil für Env (1,2)

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
98	60s	1
98	10s	
58	10s	50
72	60s	
72	210s	1
4	∞	

Tab. 10 PCR Temperaturprofil für Env-3

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
98	60s	1
98	10s	
59,2	10s	50
72	60s	
72	210s	1
4	∞	

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikationsprodukte wurden mittels qualitativer Gelelektrophorese größenspezifisch auf einem Ethidiumbromid (0,3 µg/mL) gefärbten Agarosegel dargestellt.

Das angesetzte Agarosegel (100 mL, 1,5 %) wurde in der Mikrowelle erwärmt und auf eine vorbereitete Acrylplatte gegossen, die vorher mit 2 Kämmen versehen wurde. Nachdem das Gel abgekühlt war, wurde die Puffer-Wanne mit 1xTAE Elektrophorese Puffer gefüllt, sodass eine Höhe von 5-10 mm innerhalb der Gelkammer erreicht war.

Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Gels wurden die Gelkämme entfernt.

Zur Quantifizierung der Größe der Amplikons wurde ein mitgeführter Größenstandard (Gene Ruler™ 1 kB DNA-Ladder, 100ng/μL) eingesetzt.

Der fertige PCR-Ansatz bestand aus 3 μL 3x Ladepuffer (Bromophenol blue dye) und 4 μL DNA, davon wurden 6 μL in die Kammern geladen. Für das qualitative Gel wurden 3 μL des Größenstandards aufgetragen. Die Stromzufuhr wurde aktiviert und das Gel lief zur Auftrennung bei 110 V für 50 Minuten eingestellt. Die Auswertung erfolgte mit dem System E.A.S.Y RH-3 und der dazugehörigen Software EASY Win32-System.

2.2.5 Aufreinigung von DNA

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des AMPure XP - PCR Purification Systems. Nach Übertragung der Amplikons auf eine 96 Well Platte, wurden diese mit AMPure Beads in einem Verhältnis von 1:1,6 DNA:Beads versetzt, gemischt und inkubiert. Die Reaktionsplatte wurde auf eine Super-Magnetplatte gestellt um die magnetischen Beads von der Lösung zu trennen. Die übrige Flüssigkeit wurde aufgenommen und verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 μL Ethanol und die Elution der DNA mit 30 μL TE Puffer ohne Magnet. Die Reaktionsplatte wurde ein weiteres Mal auf den Super-Magnet gestellt und inkubiert. Der Überstand wurde auf eine neue Platte pipettiert. Die isolierte DNA wurde mittels Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit ermittelt.

2.2.6 Sanger-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die Filter Amplikons der Env-3 PCR (500 Bp) der Serokonverterstudie verwendet, die nach der Aufreinigung auf 10 ng/μL DNA eingestellt wurde. Anschließend wurde ein 10 μL Ansatz aus 20 ng Probe, 2 μL BigDye 3.1 und 0,5 μL Primer eingesetzt. Als Forward-Primer fungierte FL 24-6952-SF und als Reverse-Primer FL 25-7541-SF.

Die Ansätze wurden anschließend durch das folgende Zyklusprogramm amplifiziert und darauffolgend ins hauseigene Sequenzierlabor übergeben.

Tab. 11 PCR Temperaturprofil für die DPS

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
96	60s	1
96	10s	
55	10s	25
60	60s	
4	∞	

Im Sequenzierlabor wurden die Proben gereinigt und mittels Kapillarelektrophorese analysiert.

Die Daten wurden in Geneious geladen, manuell auf die richtige Anordnung der *reverse* sowie *forward* Sequenzen überprüft und anschließend auf den ersten Frame des *env*-ORF getrimmt. Mehrdeutige Nukleotide innerhalb der erstellten Konsensussequenz wurden nach dem Standard des UPAC-IUB Schlüssels differenziert. Die erstellten Konsensussequenzen dienten zur Auswertung des Korezeptortropismus. Des Weiteren wurde für alle Probe ein Alignment errechnet. Von diesem wurden vorhandene Insertionen/Deletionen gegenüber dem Referenzgenom HXB2 entfernt, welches als Grundlage für die phylogenetischen Analysen diente.

2.2.7 Next Generation Sequencing (NGS)

Die Illumina Sequenzierung beruht im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung auf einer massiven parallelen *sequencing by synthesis* (SBS) Technologie. Dabei wird das Anheften von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden während der DNA Transkription beobachtet und somit die Abfolge der Basen determiniert. Es entstehen DNA-Bibliotheken, die fragmentierte und markierte Amplikons enthalten. Alle Schritte wurden gemäß den jeweiligen Herstellerprotokollen durchgeführt und erfolgte im hauseigenen Sequenzierlabor.

Als Vorbereitung auf die Sequenzierung wurden die Sequenzen beidseitig mit Adaptoren versehen. Die darin enthaltenen Sequenzen verhalten sich komplementär zu den *Capture Oligos* auf einer sogenannten Fließzelle (*flow cell*). Jede Fließzelle enthält zwei verschiedene *Capture Oligos*. Die zu amplifizierenden DNA-Stücke werden durch Hybridisierung der komplementären Sequenzen auf der Flow-Cell-Oberfläche festgehalten. Anschließend synthetisiert eine DNA-Polymerase einen komplementären

Strang des hybridisierten Fragments. Das entstandene doppelsträngige Molekül wird im nächsten Schritt durch Denaturierung wieder aufgetrennt und das originale Template gewaschen. Der verbleibende Einzelstrang wird durch Brücken-Amplifikation amplifiziert indem der Strang an den zweiten Adapter der Fließzelle bindet und durch eine spezifische DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang synthetisiert wird. Nach einer weiteren Denaturierung entstehen zwei Einzelstränge, die beide mit der Fließzelle verbunden sind. Dieser *Cluster* Prozess wird simultan wiederholt bis ca. 1.000 Kopien des ersten DNA Fragments einer Probe entstanden sind. Die Vervielfältigung eines gebundenen DNA Fragments ist dabei notwendig, um eine ausreichende Signalstärke für eine optische Auswertung der Fluorophore zu ermöglichen. Dabei kommen bis zu 1400 Cluster pro Quadratmillimeter FlowCell zu Stande. Für den eigentlichen Sequenzvorgang verbleiben zunächst *forward* DNA-Stränge mit gekappten Enden. Diese werden mit verschiedenen farbigen, fluoreszenzmarkierten Nukleotiden aufgefüllt, welche nach der Anheftung an die spezifische Base ein Lichtsignal emittieren. Nach Abtrennung des Farbstoffes wird dieser Zyklus für den *reverse* DNA-Strang wiederholt. Die Verarbeitung der erzeugten Daten verlief ähnlich wie bei den Daten der Sanger Sequenzierung. Es wurde jedoch statt eines *de novo* Assemblys ein Mapping auf die Referenzsequenz HXB2 durchgeführt. Hierbei wird für jedes Fragment die Position auf der Referenz detektiert, welche am besten mit dieser übereinstimmt. Nachdem alle Fragmente auf die Referenz gelegt wurden, wurde eine temporäre Konsensussequenz erstellt. Anschließend wurden erneut alle vorhandenen Fragmente auf die temporäre Konsensussequenz gemappt. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt, um Sequenzabschnitte zu generieren, welche eine geringe Übereinstimmung mit der Referenzsequenz besitzen. Besonders Insertionen und Deletionen können in diesem Verfahren nicht detektiert werden. Das finale Mapping hat eine Sequenztiefe von bis zu 50.000 Fragmenten pro sequenzierter Base. Um Sequenzier- und Mappingfehler auszuschließen, erfolgte die Erstellung der Konsensussequenz mit unterschiedlichen Grenzwerten. Hierbei wurde für jede einzelne Base die mögliche Gesamtnukleotid-Anzahl an dieser Position gezählt. Es wurden nur die ausgewertet, welche mindestens die erforderliche Anzahl innerhalb des Grenzwerts erreichten. Die drei verschiedenen Grenzwerte lagen bei 3 %, 10 % und 20 %. Wurden zum Beispiel an einer Position 90.000-mal Guanin detektiert und 10.000-mal Adenin, so wurde diese Position bei einem Grenzwert von 20 % als G bewertet. Bei einem Grenzwert von 3 % und 10 % als Mischposition R.

2.2.8 Korezeptor-Tropismus

Zur Bestimmung des Korezeptor-Tropismus der Patientenproben wurde diese nach der Sequenzierung durch Sanger bzw. NGS in Geneious® getrimmt und auf das Referenzgenom HXB2 gemappt. Der envelope Bereich innerhalb jedes einzelnen Alignments wurde kopiert und in dem Vorhersagemodell Geno2Pheno ausgewertet. Die Korezeptoranalyse wurde zum Vergleich sowohl auf die NGS sequenzierten Plasmaproben (Env-1) als auch auf die Sanger sequenzierten DPS (Env-3) angewendet. Der Algorithmus des Geno2Pheno dient als mathematische Interpretationshilfe auf Basis der Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp. Der berechnete phänotypische Resistenzfaktor ermöglicht Vorhersagen über die Wirksamkeit antiretroviraler Substanzen.

2.2.9 Phylogenetische Analysen

Phylogenie (Stammesgeschichte) ermöglicht die Untersuchung der Beziehungen z.B. zwischen Genen und Proteinen, die von einem gemeinsamen Vorfahren abstammten. Zur Erstellung der Stammbäume wurde ein Plug-In der Geneious® Software benutzt. Innerhalb dieser Arbeit wurde, für die Daten jeder Sequenziermethode, ein Sequenz-Alignment und damit ein Stammbaum erstellt. Die Auswertung erfolgte mittels *Neighbor-Joining* und *Maximum likelihood* Berechnungsmodellen (RaxML). Zur Erhöhung der statistischen Signifikanz wurde eine 1000-fache Bootstrap-Replikation durchgeführt. Die Gruppe O des HIV-1 diente als *outgroup* zur Berechnung eines gewurzelten Stammbaumes. Die Länge der Äste lieferte Rückschluss auf die Mutationen (% Nukleotidaustausche pro Position im Alignment), die zwischen den HIV Fragmenten beobachtet wurde. Ziel der phylogenetischen Analyse ist es herauszufinden, ob die Ergebnisse der Sequenziermethoden NGS und Sanger miteinander vergleichbar sind und welche Vorteile bzw. Nachteile jede Methode aufweist.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer subtypgenerischen ENV PCR (Env1-3)

Zur Etablierung einer *full-length* envelope PCR (Env-1, -2) für die Serokonverterstudie sowie einer *V3-loop* PCR (Env-3) für die Molekulare Surveillance wurden zunächst geeignete Primerkombinationen anhand einer Referenzsequenz HXB2 in Geneious[®] analysiert und anschließend getestet. Die Testphase verlief mit der laboreigenen HTLVIIIB Standardreihe. Zunächst wurden die vorher ausgewählten *forward/reverse* Primer per Temperaturgradienten auf ihre Funktionalität geprüft, um die berechnete T_A zu bestätigen. Bei einem positiven Ergebnis der Proben wurde anschließend eine Verdünnungsreihe (10^1 - 10^6 Kop./mL) durchgeführt, um eine Nachweisgrenze der Primerkombination zu ermitteln. Die gewählten Primer für die einzelnen PCR-Setups sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die *full-length* envelope PCR wurde bei den Plasmaproben und die *V3-loop* PCR bei den DPS Proben angewendet. Ein Subtypenreferenzpanel wurde ebenfalls mit beiden PCR-Setups amplifiziert, um die Nachweisgrenze weiterer Subtypen zu testen.

3.1.1 *Full-length* envelope (Env-1, -2)

Die etablierte subtypgenerische *full-length* envelope PCR (Env-1) ermöglicht die Amplifikation des kompletten *env*-ORF und soll zukünftig für die Plasmaproben der Serokonverterstudie des Robert Koch-Instituts genutzt werden. Es wurde außerdem eine Test-PCR (Env-2) angesetzt, um die Funktionalität der cDNA-Synthese zu überprüfen.

Anhand der zuvor durchgeführten Verdünnungsreihe des HTLVIIIB Stamms ergab sich für die SuperFi PCR eine Nachweisgrenze von 10^3 Kop./mL. Die folgenden Ergebnisse zeigen die amplifizierten DNA Fragmente (3200 Bp und 1600 Bp) der Plasmaproben (n=44). Diese umfassen den vollständigen *env*-ORF des HIV-1 (Abb. 7) und ein Teilstück des Fragments (Abb. 8). Die Schmelztemperatur wurde zunächst mit dem Programm Multiple Primer Analyzer ermittelt und anschließend durch einen Temperaturgradienten (53,1-68 °C) überprüft bzw. optimiert.

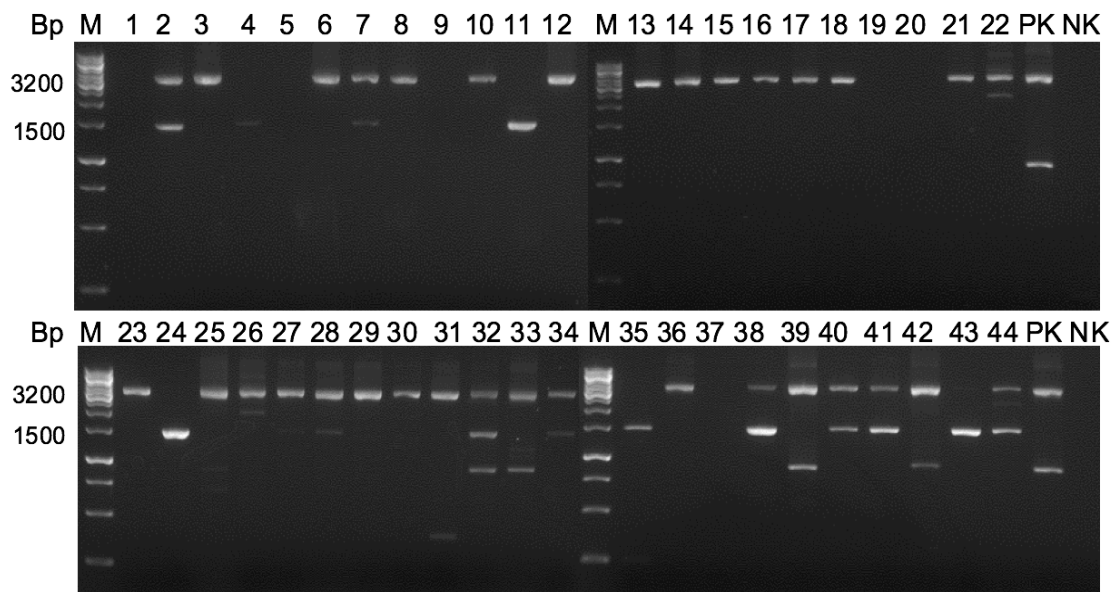


Abb. 7 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten *full-length envelope* PCR (Env-1).
 Bp: Basenpaare; M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung; Spur 1-44: Plasmaproben;
 PK: Positivkontrolle HTLVIII B (10^6 Kop./mL); NK: Negativkontrolle (negatives Plasma)

Die höchste Sensitivität der Env-1 PCR ergab sich aus der Primerkombination des *forward* Primers FL_15 und des *reverse* Primers FL_23 und einer Annealing-Temperatur von 60 °C. Von allen Proben waren 75 % (n=33) positiv und 25 % negativ (n=11). Davon ist ein Anteil von 45 % aufgrund einer zu geringen Nachweisgrenze negativ ausgefallen. Bei einigen Proben waren starke Nebenbanden zu erkennen.

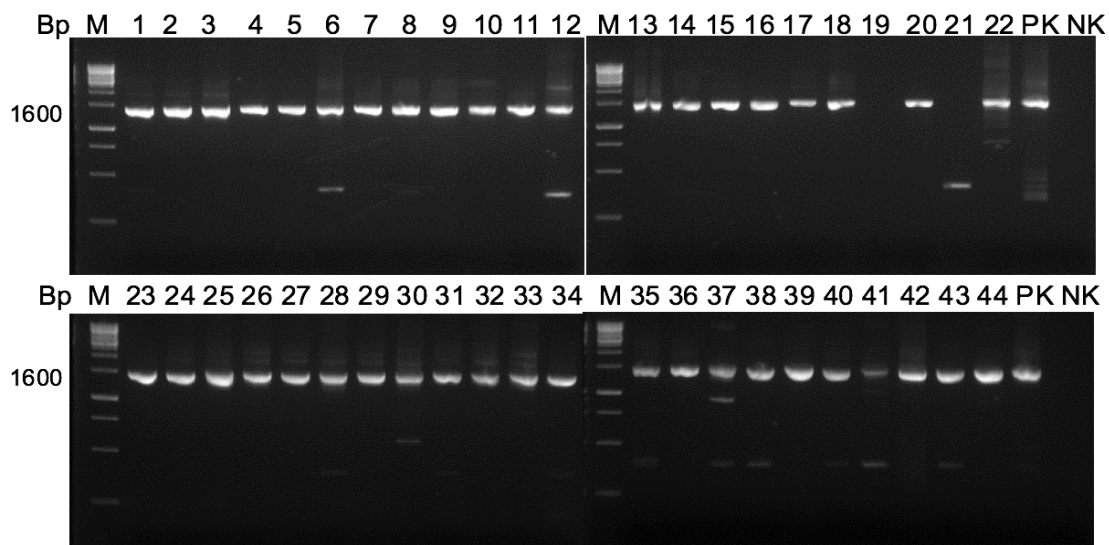


Abb. 8 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten *full-length envelope* PCR (Env-2).
 Bp: Basenpaare; M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung; Spur 1-44: Plasmaproben;
 PK: Positivkontrolle HTLVIII B (10^6 Kop./mL); NK: Negativkontrolle (negatives Plasma)

In Bezug auf Env-2 erreichte die Primerkombination des *forward* Primers FL_24 und des *reverse* Primers FL_27 die höchste Sensitivität mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C. Die Positivrate der PCR umfasst 95,5 % (n=42) und die Negativrate 4,5 % (n=2). Die Negativrate ergibt sich zu 100 % aus einer zu geringen Nachweisgrenze. In diesem PCR-Setup sind ebenfalls gelegentlich Nebenbanden zu erkennen. Da die PCR bei kurzen Fragmenten gut funktioniert und bei längeren Fragmenten häufiger versagt, ist die Anzahl an langen cDNA-Fragmenten zu niedrig und sollte erhöht werden.

3.1.2 V3-loop Region (Env-3)

Für die SuperFi PCR des V3-loops konnte eine Nachweisgrenze von 10^2 Kop./mL ermittelt werden. Diese wurden bei 4 Wochen Raumtemperatur gelagert und beinhalten 200 µL Plasma. Dieses Vorgehen simuliert die Probenqualität der Molekularen Surveillance. Die Amplifikation umfasst ein Fragment (530 Bp) des gp120, dass den V3-loop des HIV-1 enthält (Abb. 9).

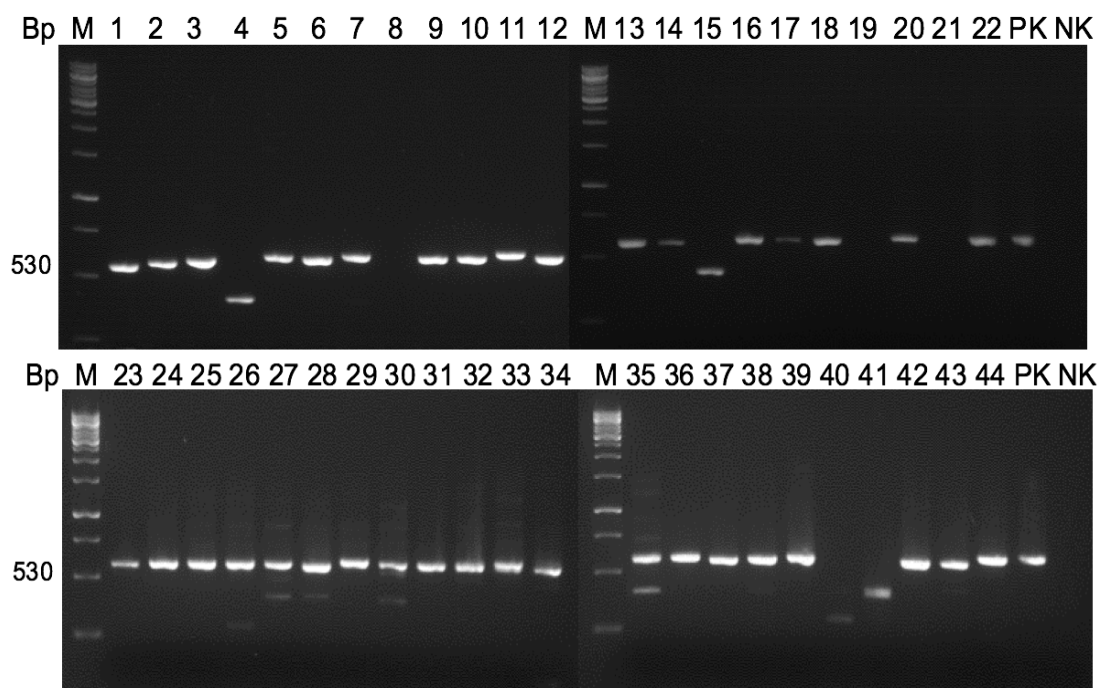


Abb. 9 Agarose-Gelbild mit PCR Produkten der etablierten V3-loop Region PCR (Env-3).
Bp: Basenpaare; M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung; Spur 1-44: Filterproben (DPS); PK: Positivkontrolle HTLVIII B (10^6 Kop./mL); NK: Negativkontrolle (negatives Plasma)

Die Primerkombination des *forward* Primers FL_24 und des *reverse* Primers FL_25 erzielte die höchste Sensitivität für Env-3. Anhand des durchgeführten Temperaturgradienten, konnte eine Annealing-Temperatur von 59,2 °C ermittelt werden.

Der Anteil der positiv amplifizierten Proben umfasst 84,1 % (n=37) und der negativen Proben 15,9 % (n=7). Davon ist ein Anteil von 71 % wegen einer zu geringen Nachweisgrenze negativ ausgefallen. Es sind nur wenige Nebenbanden aufgetreten.

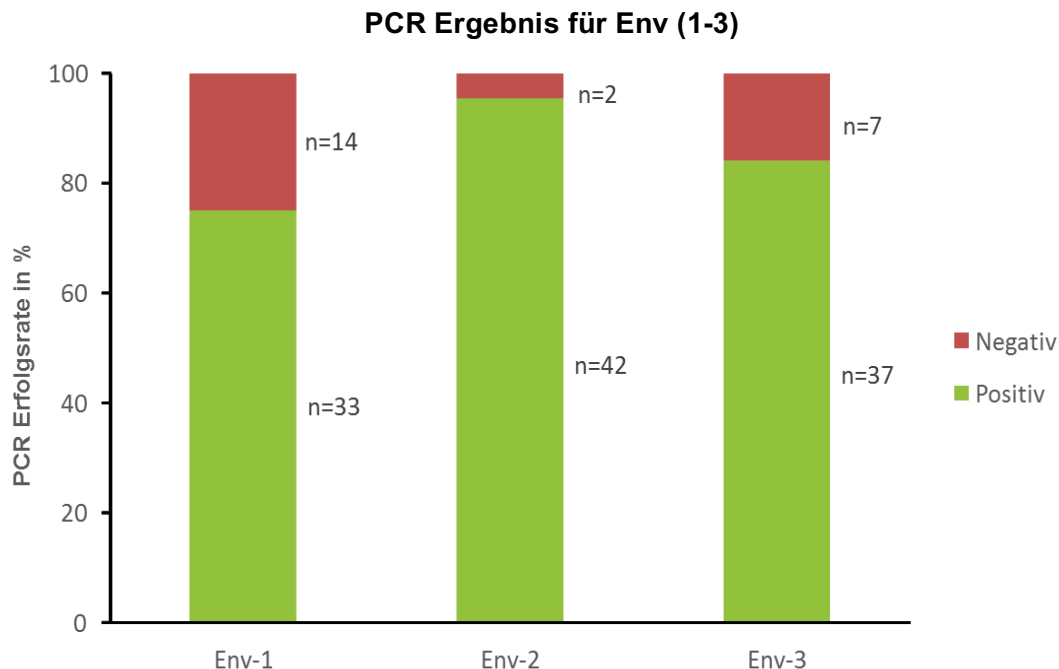


Abb. 10 Erfolgsrate der durchgeführten PCRs für Plasma (Env-1; -2) und DPS (Env-3).

Die Abbildung zeigt ein Säulendiagramm mit negativ (rot) und positiv (grün) amplifizierten Proben innerhalb des verwendeten Patientenpanels.

Eine Zusammenfassung der genannten Ergebnisse aller durchgeführten PCRs ist der Abbildung 10 zu entnehmen.

3.2 Subtypenreferenzpanel

Die neu etablierten ENV PCRs sollen es ermöglichen auch minoritäre Subtypvarianten des HIV-1 zu amplifizieren. Daher wurden die neuen PCRs auf ein Subtypenreferenzpanel mit bekannter Viruslast angewendet. Dieses dient als Referenzmaterial aus dem Überstand der Zellkulturanzucht des Labors. Die Proben umfassten die Subtypen A; B; C; D; F; G; AG und AE. Die *full-length* PCR (n=30) wurde im Rahmen einer Sensitivität von 10^2 - 10^5 Kop./mL (Abb. 11) und die *V3-loop* PCR (n=24) mit einer Verdünnungsreihe von 10^2 - 10^4 Kop./mL (Abb. 12) durchgeführt. Die Nachweisgrenzen der beiden PCRs sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Nachweisgrenzen der verschiedenen Subtypen bewegen sich in einem Bereich von

10^2 - 10^4 Kop./mL. Subtyp G beispielsweise zeigte bei der Env-1 PCR ein positives Signal bei $3,2 \times 10^3$ Kop./mL, für Env-3 bei $4,5 \times 10^4$.

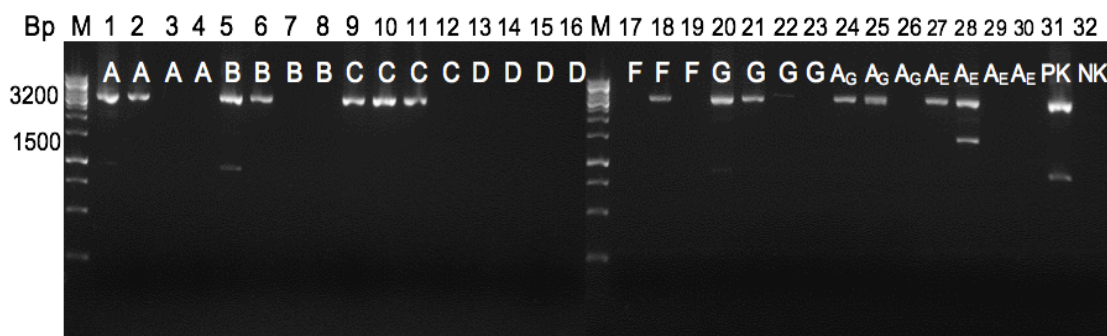


Abb. 11 Agarose- Gelbild des Subtypenreferenzpanels mit PCR Produkten der etablierten *full-length envelope* PCR (Env-1).

Bp: Basenpaare; M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung; Spur 1-30: Subtypenreferenzpanel; PK: Positivkontrolle HTLVIIIB (10^6 Kop./mL); NK: Negativkontrolle (negatives Plasma)

Die Konzentration der Env-1 PCR Proben nimmt von links nach rechts ab. Außer Subtyp D konnte jeder andere erfolgreich amplifiziert werden. Die Nachweisgrenzen variieren innerhalb der Subtypen und sind in der Tabelle 11 bzw. in der Abbildung 13 aufgetragen.

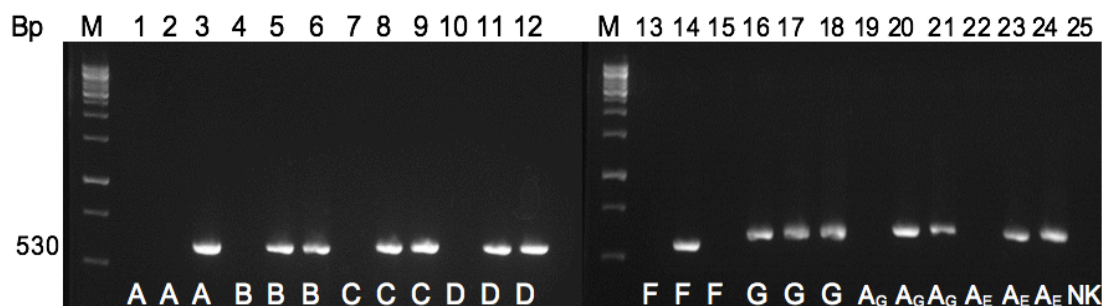


Abb. 12 Agarose-Gelbild des Subtypenreferenzpanels mit PCR Produkten der etablierten *V3-loop Region* PCR (Env-3).

Bp: Basenpaare; M: GeneRuler 1kb-Ladder (Invitrogen) zur Größenbestimmung; Spur 1-24: Subtypenreferenzpanel; NK: Negativkontrolle (negatives Plasma)

Im Gegensatz zu Env-1 nimmt die Konzentration bei Env-3 von links nach rechts zu. Jeder vorliegende Subtyp der DPS konnte mit der optimierten PCR nachgewiesen werden.

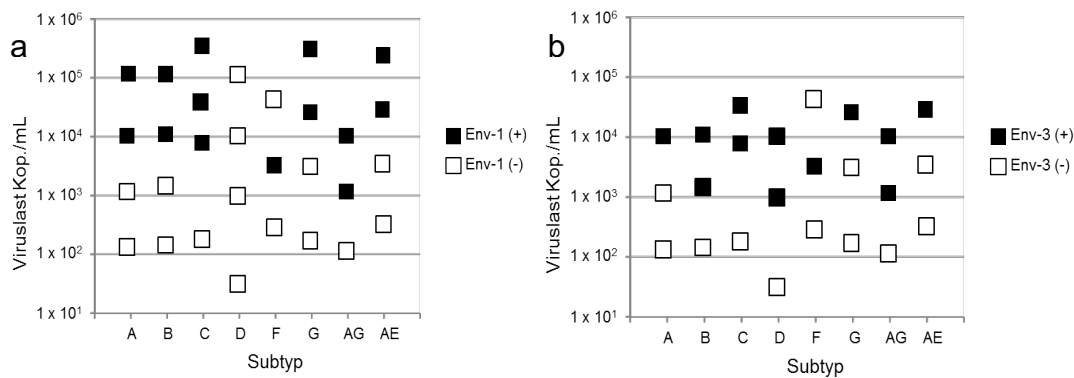


Abb. 13 Nachweisgrenzen für *full-length* (a) und *V3-loop* (b) PCR in Bezug auf das Subtypenreferenzpanel.

Erfolgsrate der Amplifikation von Env-1 und Env-3 mit einer \log_{10} Viruslast.

Tab. 12 Spezifität der *full-length* und *V3-loop* PCR

Subtyp	Nachweisgrenze in Kop./mL	
	Env-1	Env-3
A	1,2E+04	1,2E+04
B	2,3E+03	1,6E+04
C	9,8E+03	9,8E+03
D	-	1,0E+03
F	6,5E+03	6,5E+03
G	4,5E+04	3,2E+02
AG	1,6E+03	1,6E+03
AE	5,3E+04	6,5E+03

3.3 Subtypenverteilung des Patientenpanels

Die untersuchten HIV Proben aus der Serokonverterstudie umfassen einen Zeitraum von 2003 – 2017 und im Mittel einen Infektionszeitraum von 1,3 Jahren. Für das verwendete Patientenpanel ergibt sich eine spezifische vorher ausgewählte Subtypenverteilung (Abb. 14) auf deren Grundlage die PCR Ergebnisse ausgewertet wurden.

Subtypenverteilung des Patientenpanels in %

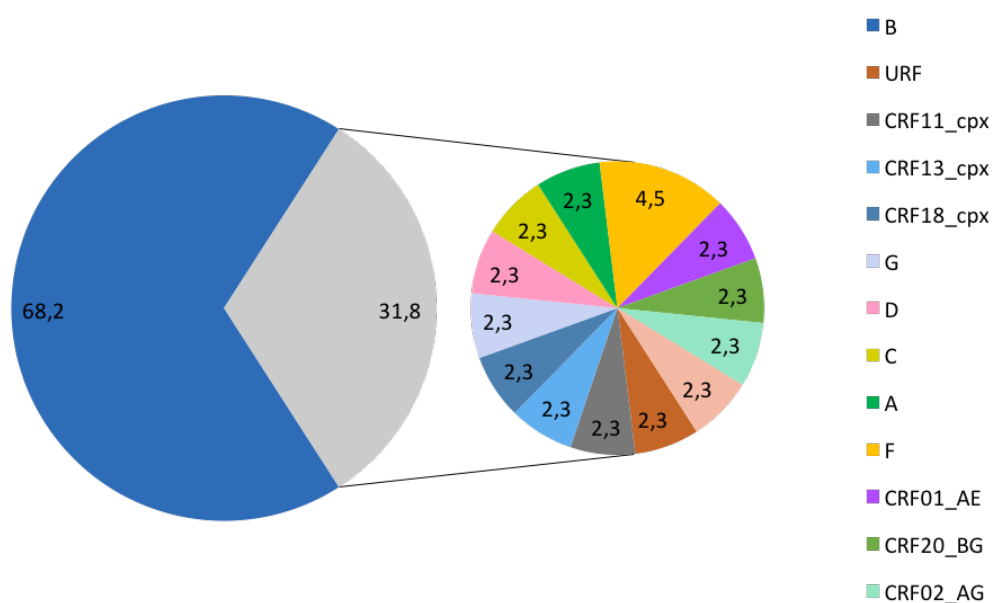


Abb. 14 Subtypenverteilung des Patientenpanels.

Die Abbildung zeigt ein Kreisdiagramm mit zwölf verschiedenen Subtypen. Darunter sieben rekombinante Formen und sechs Subtypen der Untergruppe M.

Die Subtypenbestimmung erfolgte über die Prot/RT/Int Fragmente und wurde anschließend mit einer Env Subtypenbestimmung abgestimmt (REGA HIV-1 Subtyping Tool). Es ergab sich eine Übereinstimmungsrate von 85 %, in fünf Fällen wurde durch das REGA HIV-1 Subtyping Tool ein anderer Subtyp auf Grundlage des V3-loops bestimmt.

3.4 Bestimmung des Korezeptorgebrauchs

Die Erforschung des Korezeptor-Tropismus zielt langfristig auf die Entwicklung weiterer antiretroviraler Medikamente ab. Innerhalb dieser Arbeit wurden Patientenproben durch Env-1 und Env-3 amplifiziert und danach durch NGS bzw. Sanger sequenziert.

Nach der Amplifikation und Sequenzierung der Patientenproben, wurden diese in Geneious® geladen, getrimmt und auf das Referenzgenom HXB2 gemappt. Von den zur Verfügung stehenden 44 Patientenproben konnten 41 durch Sanger und 32 durch NGS sequenziert werden. Die Bestimmung des Korezeptors erfolgte mit dem Geno2Pheno System und führte zu einer spezifischen Verteilung der Korezeptoren auf Grundlage der errechneten Falschpositivrate (*false positive rate*, FPR, Tabelle 13).

Tab. 13 Übersicht des Korezeptorgebrauchs für Env-1 und Env-3.

Scout	NGS (20 %)		Sanger	
	Env-1		Env-3	
	FPR in %	Korezeptor	FPR in %	Korezeptor
03-00170	-	-	6,9	R5X4
03-00253	6,9	R5X4	6,9	R5X4
04-00462	3,2	CXCR4	3,2	CXCR4
05-00605	-	-	-	-
05-01219	-	-	10,2	R5X4
06-00038	2,6	CXCR4	2,6	CXCR4
06-00060	13,4	R5X4	13,4	R5X4
06-00184	-	-	-	-
06-00279	-	-	1,8	CXCR4
06-00366	23,6	CCR5	23,6	CCR5
06-00677	-	-	6,8	R5X4
06-00842	6,8	R5X4	-	-
07-00229	3,4	CXCR4	3,4	CXCR4
07-00251	6,9	R5X4	-	-
07-00609	31,7	CCR5	-	-
07-00838	2,1	CXCR4	2,1	CXCR4
07-00868	28,8	CCR5	28,8	CCR5
07-01095	7,8	R5X4	7,8	R5X4
07-01180	-	-	-	-
08-00282	-	-	-	-
08-00425	8,5	R5X4	-	-
08-03401	34,6	CCR5	34,6	CCR5
08-03488	8,5	R5X4	8,5	R5X4
08-03658	-	-	0	CXCR4
08-04005	7,8	R5X4	-	-
09-00977	21	CCR5	28,2	CCR5
09-02886	2,7	CXCR4	2,8	CXCR4
09-03252	68,6	CCR5	68,6	CCR5
10-01532	4,6	CXCR4	13	R5X4
11-00697	6,8	R5X4	6,9	R5X4
11-03050	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4
11-03356	85,9	CCR5	87	CCR5
11-03459	2,6	CXCR4	2,6	CXCR4
12-01693	41,6	CCR5	14,3	R5X4
12-04096	-	-	-	-
13-00107	92,2	CCR5	95,8	CCR5
14-00227	-	-	98	CCR5

Scout	NGS (20 %)		Sanger	
	Env-1		Env-3	
	FPR in %	Korezeptor	FPR in %	Korezeptor
14-01568	15,6	CCR5	15,6	CCR5
14-03090	75,3	CCR5	75,3	CCR5
14-03658	1,7	CXCR4	-	-
15-01671	10,5	R5X4	-	-
16-00815	41,3	CCR5	41,3	CCR5
17-02270	-	-	6,7	R5X4
17-02984	55,4	CCR5	55,4	CCR5

Für 14 Proben fehlte die äquivalente Sequenz entweder für Sanger oder für NGS. Unter Verwendung des Algorithmus (FPR < 5 = CXCR4, 5 – 15 = R5X4, > 15 = CCR5) wurden für die Sanger sequenzierten Fragmente sieben X4-, sieben dualtrope R5X4- und elf R5-Viren identifiziert. Für die infizierten Patienten der NGS sequenzierten Fragmente wurden acht X4-, fünf dualtrope R5X4- und zwölf R5-Viren erkannt (Abb. 15). Bei zwei Sequenzen (10-01532, 12-01693) gibt es keine Übereinstimmung der Korezeptorbestimmung für Sanger und NGS.

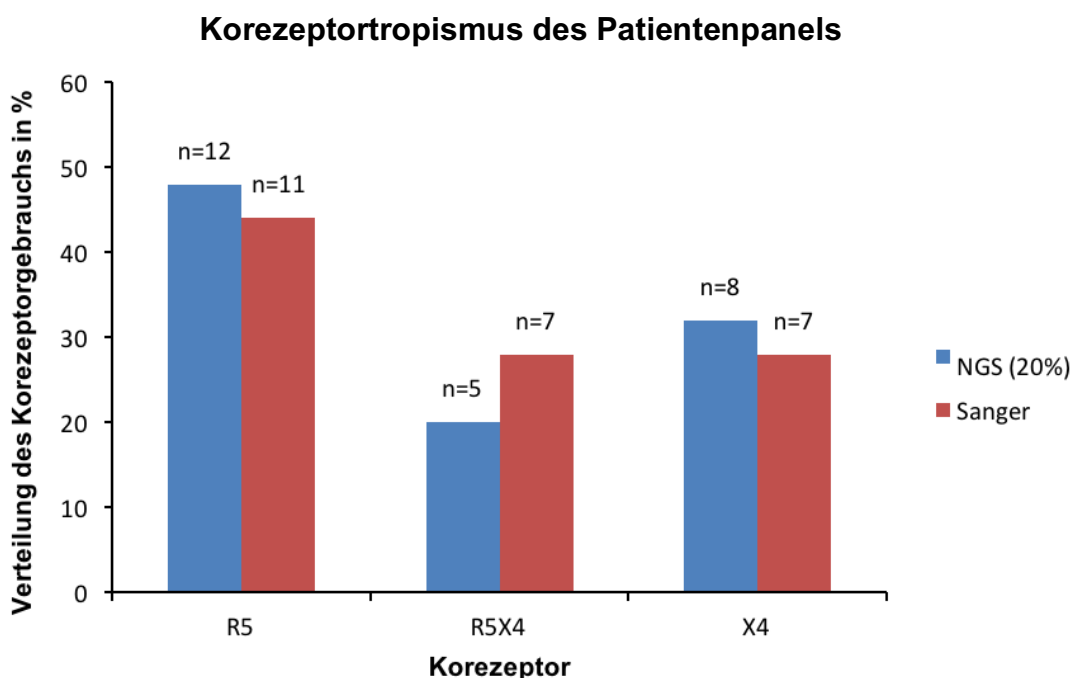


Abb. 15 Vorhersage für den Korezeptortropismus (R5, R5X4, X4) des Patientenpanels.

Die Abbildung zeigt ein Säulendiagramm mit der Verteilung des Korezeptorgebrauchs in % gegen den ermittelten Korezeptor für die Sequenziermethoden Sanger (rot) und NGS mit einem Grenzwert von 20% (blau).

Für den Korezeptorgebrauch wurde beschrieben, dass im Verlauf der HIV Infektion ein Wandel von R5 zu X4 Viren stattfindet (Schuitemaker 2011). Dieser sollte für das Patientenset überprüft werden, da der Anteil an X4-tropen Viren verhältnismäßig hoch war. Hierzu wurden die FPR mit der bekannten Infektionsdauer korreliert (Abb. 16). In diesem Patientenpanel konnte kein signifikanter Einfluss der Dauer einer Infektion auf den Korezeptortropismus festgestellt werden ($t = -2,04$, $P > 0,05$).

Einfluss der Infektionsdauer auf den Korezeptorgebrauch

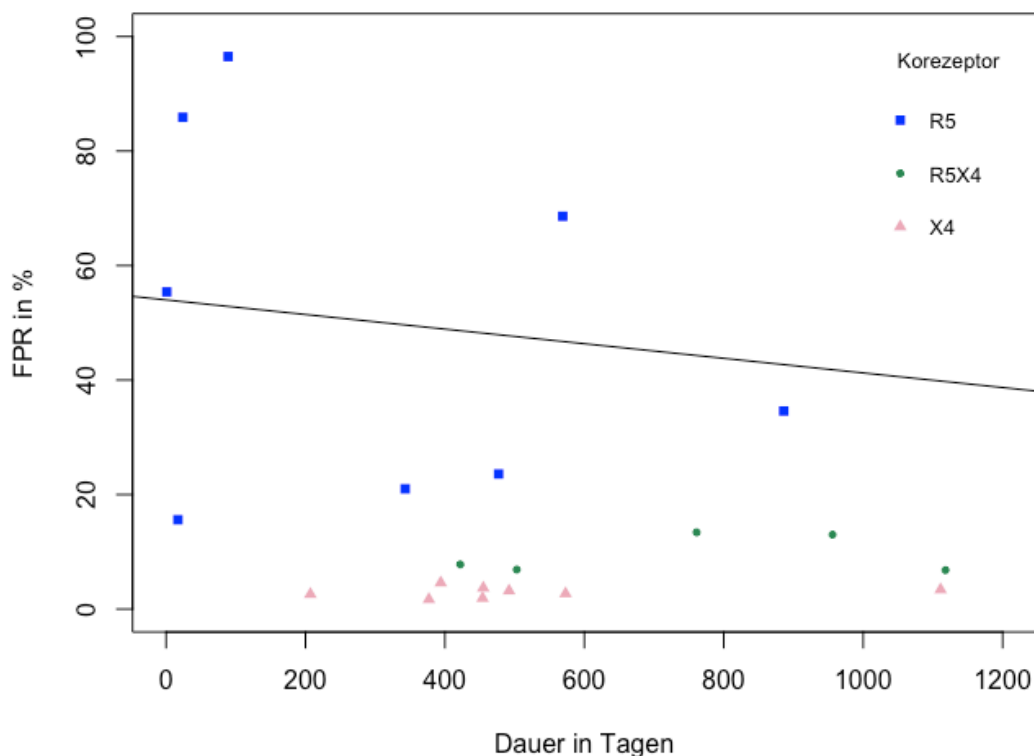


Abb. 16 Einfluss der Infektionsdauer auf den Korezeptorgebrauch (R5, R5X4, X4) der Viren. Dauer in Tagen gegen FPR mit einer negativen Regressionslinie. Die Abbildung zeigt ein Streudiagramm des Korezeptorgebrauchs von Viren innerhalb der sequenzierten Patientenproben.

3.5 Phylogenetische Analyse des Patientenpanels

Phylogenetische Bäume werden benutzt, um evolutionäre Beziehungen unter Sequenzen darzustellen. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein phylogenetischer Vergleich angesetzt, der zeigen soll, ob die Länge der Fragmente einen Einfluss auf die Qualität der erstellten Stammbäume hat. Dazu wurde der Env-1, dem Env-3 Baum gegenübergestellt.

Für jede Sequenziermethode (NGS bzw. Sanger) wurde jeweils ein *Maximum likelihood* Baum mithilfe der Software IQ-Tree erstellt. Die Berechnung der Bootstrap-Werte

erfolgte mit 10.000 Replikaten. Sowohl mit dem 3.200 Bp Fragment als auch mit dem 500 Bp Fragment bildeten sich die monophyletischen Gruppen der Subtypen ab. Innerhalb des 3.200 Bp Baumes bildet die CRF mit den Subtypen A und G eine eigene signifikante monophyletische Gruppe aus. Diese ist mit dem 500 Bp Fragment nicht zu beobachten. Im direkten Vergleich zeigten sich deutlich mehr signifikante Cluster im 3.200 Bp Baum gegenüber dem 500 Bp Baum (Vergleich 17 zu 7, siehe Abb. 17).

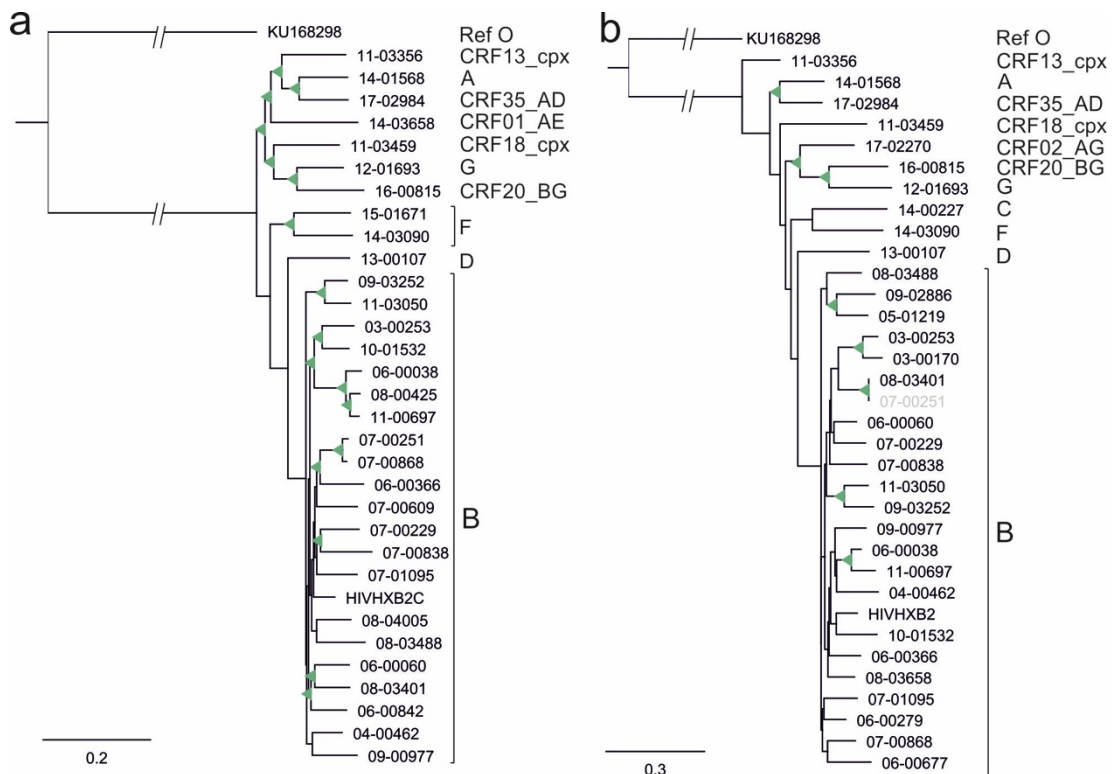


Abb. 17 Vergleich der beiden phylogenetischen Bäume für das verwendete Patientenpanel.

Die Bäume wurden auf Grundlage der aus NGS (a) und Sangersequenzierung (b) hervorgegangenen Sequenzen von zwei verschiedenen großen Fragmenten (full-length; V3-loop) erstellt. Der Subtyp O (O.FR.06 KU168298) diente als Außengruppe und HXB2 als Referenzstamm für Subtyp B. Es wurde eine 10.000-fache Bootstrap-Replikation durchgeführt. In der Mitte der Bäume sind die Subtypen der untersuchten Patientensets aufgetragen. Grüne Dreiecke bezeichnen Klade mit signifikanten Bootstrapwerten ≥ 70 . Ref.: Referenzstamm

Aus den erstellten Sequenz-Alignments wurden zwei weitere Stammbäume berechnet um diese direkt zu vergleichen. Hierzu wurden nur Isolate verwendet die sowohl in NGS als auch Sanger erfolgreich sequenziert werden konnten ($n=25$). Der phylogenetische Vergleich erfolgte mit dem Softwaretool compare2trees. Dieser hebt die Gemeinsamkeiten sowie die Unterschiede der Stammbäume hervor. Hierfür wurde der Baum für die NGS sequenzierte *full-length* Env-1 PCR dem Baum für die Sanger sequenzierte *V3-loop* Env-3 PCR gegenübergestellt (Abb. 18).

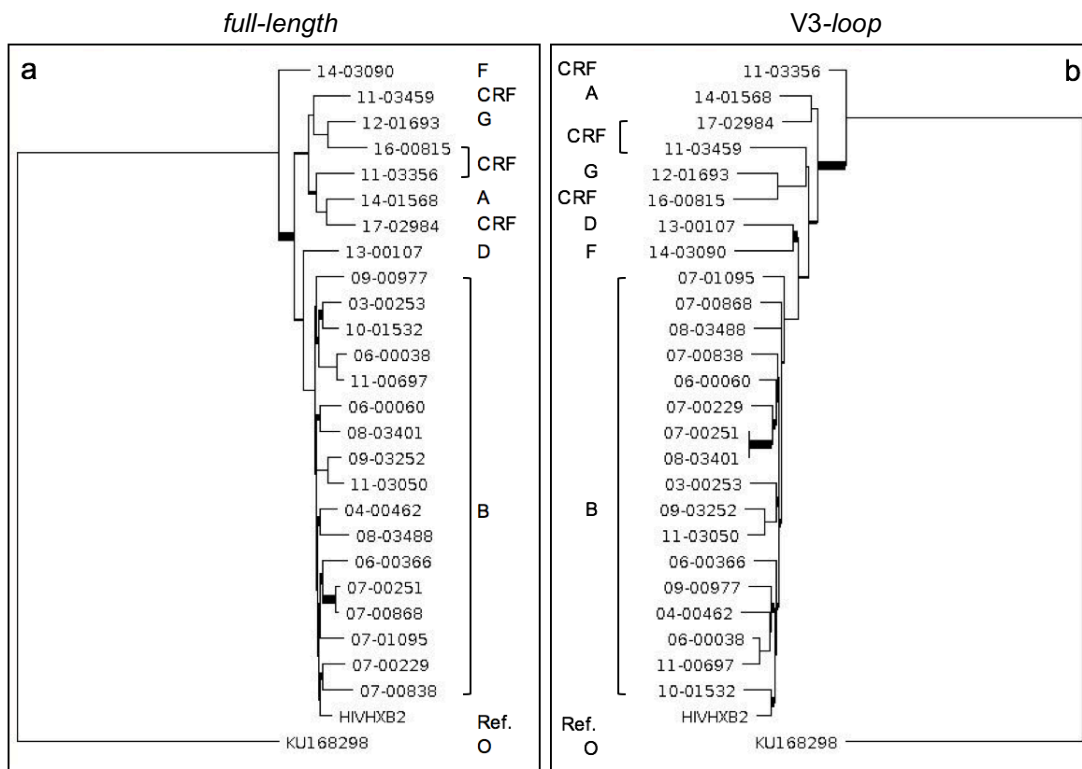


Abb. 18 Vergleich der beiden phylogenetischen Bäume für das verwendete Patientenpanel mit compare2tree.

Die Bäume wurden auf Grundlage der aus NGS (a) und Sanger (b) hervorgegangenen Sequenzen von zwei verschiedenen großen Fragmenten (*full-length*; *V3-loop*) erstellt. Für den direkten Vergleich wurden nur übereinstimmende Isolate verwendet. Der Subtyp O (O.FR.06 KU168298) diente als Außengruppe und HXB2 als Referenzstamm für Subtyp B. Es wurde eine 1000-fache Bootstrap-Replikation durchgeführt. In der Mitte der Bäume sind die Subtypen der untersuchten Patientensets aufgetragen. Ref.: Referenzstamm

Der topologische Gesamtwert liegt bei 58 % und ist ein allgemeines Maß für die Ähnlichkeit der Stammbäume zueinander. Die Breite der Äste zeigt den topologischen Wert für jeden Ast an. Ein breiterer Ast bedeutet einen geringeren Wert.

4. Diskussion

Seit der Entdeckung von HIV, wurden global immer neue Subtypen und im Besonderen zirkulierende rekombinante Formen detektiert. Die antiretrovirale Therapie der HIV-1 Infektion hat zum Ziel eine lebenslange Virussuppression innerhalb des Körpers zu erreichen. Hierbei wurden Medikamente entwickelt die besonders auf HIV-1 Subtyp B abzielen, jedoch auch in non-B Subtypen wirksam sind. Allerdings machen die non-B Subtypen mittlerweile 90 % in der Populationsdynamik der globalen HIV-Pandemie aus (Braun, P., Knechten H. 2015).

Die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente könnte je nach Subtyp variieren und eine Resistenzentwicklung beeinflussen (Kosakovsky Pond, S. L. et al 2009). Demzufolge wird es immer wichtiger werden, den Kenntnisstand über non-B Subtypen zu erweitern, um langfristig gesehen eine individuell angepasste antiretrovirale Therapie anbieten zu können. Das Eindringen eines HIV-Partikels in die Wirtszelle bedingt einen spezifischen Korezeptor. Ohne diesen ist eine Fusion mit der Wirtszelle nicht möglich. Der bisher vorhandene Fusionsinhibitor Maraviroc verhindert diese Bindung an den Korezeptor, blockiert jedoch nur den humanen CCR5 Chemokinrezeptor. Bestimmte HIV-1 Partikel sind jedoch in der Lage über mindestens einen alternativen Korezeptor (CXCR4) mit der Zielzelle zu fusionieren. Die Korezeptorbestimmung ermöglicht daher den gezielten Einsatz von Fusionsinhibitoren und verhindert somit die Infektion der Zielzelle mit HIV. Um den Korezeptortropismus untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PCR entwickelt, die es ermöglicht spezifische Abschnitte des *env*-ORFs zu amplifizieren. Nach Erfüllung dieser Voraussetzung, konnte das V3 Motiv, welches den Korezeptorgebrauch determiniert, sequenziert und analysiert werden.

4.1 PCR Design

Es wurde versucht zwei verbesserte PCRs zu etablieren, die zukünftig für die Proben der Molekularen Surveillance von HIV sowie der Serokonverterstudie am Robert Koch-Institut genutzt werden können. Ein besonderer Unterschied dieser beiden Studien ist die stark variierende Qualität des Ausgangsmaterials. Für die PCR wurden zunächst diverse Primerkombinationen mit einer Verdünnungsreihe von HTLVIII B getestet und anschließend auf das Patienten- sowie das Subtypenpanel angewendet. Für die Etablierung der subtypgenerischen Env-PCR wurden zwei Arbeitspakete entwickelt. Zum einen die Entwicklung einer *full-length* PCR, die ein Amplikon des gesamten *env*-

ORFs generiert und zum anderen eine hochsensitive PCR für einen amplifizierten Genombereich, der auf die Position des gp120 V3-*loop* zugeschnitten ist.

Zur Etablierung des PCR-Setups wurden sowohl eine aktuelle Reverse Transkriptase verwendet als auch der Einsatz von RNaseH geprüft um bessere Produktausbeuten zu erhalten. Zusätzlich musste eine neue Polymerase gefunden werden, welche nicht nur eine *proofreading* Funktion besitzt, sondern auch in der Lage ist Lange Fragmente mit komplexen Sekundärstrukturen zu amplifizieren. Besonders bei dem größeren Fragment der *full-length* PCR (Env-1) wurde der Umstieg auf neue Enzyme essentiell. Für die darauffolgende Amplifikation ist die richtige Annealing-Temperatur essentiell. Diese liegt der Basenzusammensetzung der Primer zugrunde und führt bei zu niedrigen Temperaturen zu Fehlpaarungen sowie multiplen PCR Produkten. Bei zu hohen Temperaturen hingegen erfolgt eventuell eine instabile Primer-Hybridisierung und somit eine verminderte PCR-Ausbeute. Um die korrekte Schmelztemperatur zu finden, wurde für jede Primerkombination ein Temperaturgradient durchgeführt. Das stärkste Signal konnte bei einer Temperatur von 60 °C (Env-1), 58 °C (Env-2) bzw. 59,2 °C (Env-3) festgestellt werden. Besonders problematisch blieben unspezifische Nebenbanden, die besonders bei niedrigen Viruslasten auftraten und zu einem Verlust an Rohdaten nach der NGS Sequenzierung führten. Reproduzierbar trat eine Nebenbande bei ≈ 1.500 Bp auf. Diese könnte durch eine Fehlbindung auftreten als auch durch eine Sekundärstruktur innerhalb der *env* cDNA. Proben mit Nebenbande wurden dennoch in die Sequenzierung übernommen, um abschätzen zu können, wie stark der Einfluss dieser ungewollten Nebenbande war. Der Anteil an ungenutzten Reads für das Set aus 33 Isolaten lag bei 0,04 % und 83,58 %. In der Detail-Auswertung zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der Nebenbande und dem Anteil an ungenutzten Rohdaten (Daten nicht gezeigt). Ein hoher Anteil an nicht verwendbaren Rohdaten führt auf Dauer zu höheren Sequenzierkosten und kann in besonderen Fällen dazu führen, dass Isolate nicht ausgewertet werden können. Eine Reduktion der Anzahl an PCR-Zyklen könnte zu einer Reduktion von unspezifischen Nebenbanden führen, würde aber im Verlust an schwach positiven Proben resultieren.

4.2 Sensitivität der etablierten PCRs

Die *full-length* PCR (Env-1) erreichte in der Testphase eine Nachweisgrenze von 10^3 Kop./mL und zeigte für 75 % Patientenproben eine gelungene Amplifikation. Die V3-*loop* PCR (Env-3) zeigte für den Laborstandard HTLVIIIB eine Nachweisgrenze von 10^2 Kop./mL sowie eine Positivrate von 84,1 % der Patientenproben vor. Im Folgenden

werden mögliche Gründe für negative Signale bzw. Nebenbanden einiger Patientenproben analysiert.

In mehreren Fällen (03-00170; 07-00609; 07-01180; 08-00425; 08-03658) handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine zu geringe Konzentration der Ziel-DNA für die etablierte PCR. Die Viruslast dieser Patienten liegt z.T. unter oder nur knapp über der getesteten Nachweisgrenze der Verdünnungsreihe. Geringe Pipettierfehler oder die Degeneration der RNA über die Zeit können in diesem Fall Gründe für das negative Signal darstellen.

Bei einem Patienten (05-00605) handelte es sich um ein URF (*unique recombinant form*) Isolat und bei weiteren sieben Patienten (08-00282; 11-03356; 11-03459; 14-03658; 16-00815; 17-02270; 17-02984) um CRFs (*circular recombinant form*). Rekombinante Formen weisen eine hohe genetische Diversität auf und bestehen aus einer Mischung von bereits bestehenden Subtypen. Die Mosaik Genomstruktur kann eine effiziente cDNA-Synthese durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der viralen RNA beeinträchtigen. Es kann dadurch zu Syntheseabbrüchen der Reversen Transkriptase kommen (Klarmann, G. et al 1993). Außerdem ist es möglich, dass Fehlpaarungen in sowohl *forward* als auch *reverse* Primern wiederum zu falsch positiven Signalen führen und sich als Nebenbanden äußern (Chook, et al 2015). Env-1 konnte im Gegensatz zu Env-3 die Subtypen CRF11_cpx (08-00282) und CRF02_AG (17-022770) trotz ausreichender Viruslast nicht amplifizieren. Bei näherer Betrachtung beider Genome lässt sich feststellen, dass CRF11_cpx aus den Subtypen A, E, G, J sowie U besteht und innerhalb des *env*-ORFs große Diversität aufweist. Das geschnittene Fragment (3.200 Bp) liegt bei diesem CRF im Bereich des Subtyps J und A. Das kleinere Fragment (500 Bp) des Env-3 umfasst hingegen ausschließlich den Bereich des Subtyps A und erklärt das positive Signal für diese PCR. Der Stamm CRF02_AG besteht aus den Subtypen A und G und weist bei Env-1 nur eine Nebenbande eines kleineren Fragments (1.500 Bp) auf. Diese Nebenbande tritt bei allen CRFs der Env-1 PCR auf (Abb. 7) und zeigt, dass die Primerkombination aufgrund des hypervariablen Env-Genombereichs der Rekombinanten Formen zusätzlich unspezifische Amplifikationsprodukte gebildet hat. Der Subtyp CRF_AE eines Patienten (14-03658) zeigte kein Signal bei 3200 Bp, allerdings eine schwache Nebenbande. Der *env*-ORF variiert zwischen den Subtypen A und E innerhalb des Env-3 Amplikons. Im Vergleich dazu umfasst der Hybridisierungsbereich des Env-1 nur den Subtyp A und wies ein positives Signal auf. Im Falle des URF Isolats und zwei weiteren Patienten (07-00609; 15-01671) mit den Subtypen B und F wurde humanes Material amplifiziert bzw. sequenziert, dass ebenfalls als schwache Nebenbande auf dem Gelbild erschien. Wahrscheinlich aufgrund von einer

geringen Viruslast, haben auch in diesem Fall die Primer unspezifisch gebunden. Allerdings konnte dieses Ergebnis durch den Mappingalgorithmus der NGS Sequenzierung entfernt werden. In Rahmen der Sanger Sequenzierung konnte das humane Material in Genieous® nicht eliminiert werden, da jeweils nur eine *forward* und eine *reverse* Sequenz zur Verfügung stand. Diese Nebenbanden führten bei vier Isolaten zu einem verstärkten Hintergrundsignal welches die Auswertung deutlich erschwerte oder unmöglich machte.

4.3 Subtypenreferenzpanel

Zur Untersuchung einiger Gruppe M Subtypen (A; B; C; D; F; G; AG, AE) des HIV-1 wurde ein Subtypreferenzpanel mit bekannter Viruslast in die Arbeit aufgenommen. Es dient weiterhin der Überprüfung der etablierten PCRs und soll Aufschluss darüber geben, welche Subtypen mit der entwickelten Methode amplifiziert werden können.

Innerhalb der Env-1 PCR konnte nur Subtyp D nicht nachgewiesen bzw. amplifiziert werden. Mit der Env-3 PCR konnte hingegen jeder Subtyp erfolgreich amplifiziert werden. Der Ausstieg des Subtyps D des Env-1 kann verschiedene Ursachen haben, wie z.B. die große Diversität des Subtyps innerhalb des *env*-ORFs und der daraus resultierenden unspezifischen Hybridisierung der Primer. Besonders größere Deletionen konnten in veröffentlichten Referenzsequenzen beobachtet werden. Interessant war hier der Vergleich zwischen Subtypenpanel und Patientenpanel. Der Ausfall der Probe 17-02277 steht im direkten Widerspruch zu den Ergebnissen für die Sensitivitätstestung. Hier konnte CRF02_AG erfolgreich bis 1000 Kop./mL amplifiziert werden, die Patientenprobe 17-02277 zeigte eine Viruslast von 200.000 Kop./mL. Eine mögliche Erklärung wären individuelle Mutationen oder größere Deletionen an den Primerbindungsstellen, die zu einem PCR Versagen führten. Ebenfalls erstaunlich war der Ausfall der PCR für den Subtyp D im Subtypreferenzpanel. Die Probe 13-00107 (Subtyp D) konnte dennoch mit allen PCRs erfolgreich amplifiziert werden.

4.4 Korezeptorgebrauch

Die Bestimmung der Korezeptoren zu Therapie Zwecken ist einzigartig für HIV Infektionen. Der Korezeptor-Tropismus spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Virus an die Zielzelle. Der Fusionsvorgang involviert hauptsächlich zwei Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4, die dem Virus Genom zugeordnet werden können. Am Anfang einer HIV-Infektion tendieren virale Isolate beim Eintritt in die Zelle

eher zu CCR5-Korezeptoren, spätere Isolate hingegen zeigen den Gebrauch von CXCR4 (Bleul, C. C. et al 1997). Eine einzige Aminosäuren Mutation innerhalb des V3-loops reicht aus, damit das Virus von einem R5- zu einem X4-tropen bzw. einem R5X4-dualtropen Virus übergehen kann. Dualtrope Viren können in jedem Stadium einer Infektion auftreten (De Jong, J. J et al, 1992).

Nach erfolgter Sequenzierung des Envelope-Genombereichs des Patientenpanels, wurde mit Hilfe des Geno2Pheno Modells die Region des viralen gp120 V3-loops analysiert und eine Korezeptor-Vorhersage für jede erfolgreiche Sequenz getroffen. Dies geschah separat für Sanger bzw. die NGS Proben. Die NGS Sequenzen wurden zudem zur Detektion von minoritären Varianten unter verschiedenen Grenzwerten (3 %; 10 %; 20 %) betrachtet. Die erhobenen Daten wurden vorher spezifisch ausgewählt und stellen daher keine allgemeine Population dar. Aufgrund dessen ist die vorliegende Verteilung der Korezeptoren für die deutsche Bevölkerung nicht aussagekräftig. Insgesamt waren 28 Patientenproben sowohl für Sanger als auch für NGS vergleichbar. Zwei Proben (10-01532; 12-01693) zeigten jedoch ein unterschiedliches Ergebnis für den Korezeptorgebrauch. Bei näherer Betrachtung der NGS Sequenz 10-01532 zeigte sich ein Austausch von 5 Nukleotiden und bei der Sanger Sequenz 12-01693 eine große Lücke innerhalb des V3-loops. Diese beiden Ergebnisse erklären die unterschiedliche Bestimmung des Korezeptors.

Allgemein wird angenommen, dass NGS gegenüber der Sangersequenzierung für das frühzeitige Erkennen eines Korezeptorwechsels von Vorteil ist. Dies liegt im Besonderen daran, dass tausende von Einzelfragmenten sequenziert werden und dadurch eine sogenannte Sequenztiefe erreicht wird, die mit der herkömmlichen Sangersequenzierung nicht möglich ist. Damit sind NGS im Vergleich zu Sanger Ergebnissen aussagekräftiger.

Die Hypothese, dass die Infektionsdauer einen Einfluss auf die Wahl des Korezeptors hat, konnte für dieses Patientenpanel nicht bestätigt werden (Abb. 15). Das Ergebnis zeigt jedoch deutlich, dass auch zu Beginn einer HIV-1 Infektion sowohl X4-Viren als auch Dualtrope Viren auftreten und bis zu drei Jahren nachweisbar sind oder bereits ab 200 Tagen auftreten. Dies steht in Übereinstimmung zu bisherigen Ergebnissen, die einen Wechsel von 25 % der Viren nach den ersten 5 Jahren Infektion beobachtet haben (Foster, C. et al 2015).

Der Geno2Pheno Algorithmus ist eines der kostenlosen und am häufigsten genutzten Vorhersagemodelle im Internet, dennoch ist die Konkordanz dieses und ähnlicher Tools begrenzt. Auf der einen Seite kann eine Genotypisierung nicht die Replikationskompetenz von Minoritäten vorhersagen. Auf der anderen Seite verlieren

phänotypische Prüfungen durch den initialen Selektionsprozess an Sensibilität (Rieder, P. et al 2011). Außerdem wurde das Geno2Pheno Tool auf die V3 Sequenzen der Subtypen B und C trainiert, daher ist es fragwürdig ob es sich auch für die Vorhersage von non-B bzw. non-C Subtypen eignet. Riemenschneider et al entdeckten, dass die Subtypen von A und CRFs mit einer sehr geringen Sensitivität von unter 20 % vorhergesagt wurden (Riemenschneider, M. 2016). Für eine möglichst genaue Korezeptorbestimmung sollten daher auch andere Tools genutzt werden, die andere Trainingsdatensätze nutzen.

4.5 Phylogenie

Viele biologische Analysen involvieren phylogenetische Bäume, die auf einem Sequenzdatensatz basieren. Der Vergleich von Sequenzinformationen über einen phylogenetischen Baum ermöglicht einen Einblick in die Konsensus Muster der Evolution von Genen, zeigte Verwandtschaften zu weiteren Isolaten und hebt Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in deren Struktur hervor. Ein möglicher Qualitätsunterschied ergibt sich aus der durchgeführten Sequenziermethode. Innerhalb dieser Arbeit wurde für jede Methode, NGS bzw. Sanger, jeweils ein phylogenetischer Baum erstellt um diese miteinander zu vergleichen. Ziel dieses Vergleiches war die Überprüfung, ob durch Sequenzierung des hochvariablen gp120 V3-loops eine ausreichende phylogenetische Diskriminierung einzelner Isolate ermöglicht wird. Wie in Abbildung 17b zu erkennen ist, bildet sich für den Subtyp B, mit dem 500 Bp Bereich des V3-loops, eine monophyletische Gruppe. Die Signifikanzwerte für diese Gruppe liegen jedoch unter 70 %. Alle weiteren einzelnen Subtypen bilden keine eigene monophyletische Gruppe und zeigen nur für das Cluster aus Subtyp G, CRF02_AG und CRF20_BG einen signifikanten Bootstrapwert. Im Vergleich dazu bilden sich für die Analyse des 3.200 Bp Fragmentes sowohl signifikante monophyletische Gruppen auf Subtypebene als auch mehrere signifikante Cluster auf Isolatebene aus.

Im direkten Vergleich mit dem Programm compare2trees konnte für die Proben ein topologischer Wert berechnet werden, der ein Maß für die Übereinstimmung der Bäume darstellt.

Der berechnete topologische Gesamtwert beschreibt, dass sich die Bäume zu 58 % ähnlich sind (Abb. 18). Beeinflusst wird der Wert unter anderem durch die unterschiedlichen Sequenzlängen. Der NGS Baum besteht aus 3.200 Bp, der Sanger Baum hingegen nur aus 500 Bp Sequenzen. Längere Sequenzen enthalten mehr Informationen, die die Zuordnungen von Orthologien erweitern und somit verlässlichere

Verwandtschaftsbeziehungen aufzeigen können. Die Beziehungen beruhen auf der Anzahl der ausgetauschten Nukleotide, also der Anzahl der Mutationen.

Die Probe 10-01532 wurde im NGS Baum als näher verwandt zu dem Referenzstamm HXB2 eingeschätzt als im Sanger Baum. Im NGS Baum wurden im Vergleich zu HXB2 210 Bp ausgetauscht (single nucleotide polymorphisms, SNP), im Sanger Baum lediglich 56 Bp. Ein weiteres Beispiel sind die Isolate 06-00060 und 08-03401, diese bilden im 3.200 Bp Stammbaum ein signifikantes Cluster, im 500 Bp Baum sind diese jedoch in unterschiedlichen Kladen zugeordnet (Vergleich 54 SNP zu 305 SNP). Diese Beispiele zeigen, dass das Potential zur Differenzierung zwischen den Sequenzen innerhalb des NGS Baums mit einem 3.200 Bp Alignment im Verhältnis größer ist. Aufgrund der häufigeren Nukleotidaustausche ist auch die statistische Belastbarkeit höher.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung antiretroviraler Medikamente förderte in den letzten Jahren sowohl die Prävention von HIV als auch die Verbesserung des Krankheitsbildes infizierter Patienten. Im Angesicht, der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber antiretroviraler Medikamente, ist es notwendig die Forschung diesbezüglich zu vertiefen. Das Wissen über die Expression und Regulation der Korezeptoren ist von großer Bedeutung für das Verstehen der HIV Pathogenität.

Das Ziel dieser Arbeit war es ein einfaches und robustes polymerase Kettenreaktion Setup (polymerase chain reaction, PCR) zu etablieren, um von HIV-positivem Plasma als auch von getrockneten Serum Proben der Serokonverterstudie bzw. der Molekularen Surveillance den HIV Korezeptorgebrauch zu bestimmen. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine subtypgenerische *full-length* envelope PCR etabliert. Diese ist in der Lage, den gesamten *env open reading frame* zu amplifizieren, sodass die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 aus humanem Plasma sequenziert werden können. Die Arbeit umfasst weiterhin die Etablierung einer hochsensitiven PCR zur Amplifikation des gp120 V3-loops und dessen Sequenzierung durch Next Generation Sequencing (NGS, Illumina).

Die Erforschung des Korezeptor-Tropismus erfolgte auf Grundlage des V3-loops und ermöglichte es, den Korezeptorgebrauch der Infektionsdauer gegenüberzustellen. In dieser Arbeit konnten erfolgreich zwei PCR-Setups etabliert werden, um diese Fragenstellung, besonders im Zuge der Umstellung auf NGS basierte Verfahren, zu ermöglichen. Für filtergetrocknetes Material konnte eine sehr gute Nachweisgrenze von 10^2 Kop./mL für das 500 Bp Amplikon und für das 3200 Bp Amplikon der Plasmaproben eine ausreichend gute Nachweisgrenze von 10^3 Kop./mL erreicht werden. Die Sequenzierung des *full-length env* mittels NGS war erfolgreich und eine Ableitung des Korezeptorgebrauchs war bis zu einem Minoritätengrenzwert von bis zu 3 % möglich. Das etablierte PCR-Setup wird einen wichtigen Beitrag leisten, um den Anteil übertragener X4-Troper Viren zu berechnen. Die Nutzung von Maraviroc als Korezeptorantagonist zur Behandlung von HIV-1 Infektionen unterstreicht die Wichtigkeit eines aufmerksamen klinischen Monitorings der virologischen Antwort eines unter Therapie stehenden Patienten.

6. Summary

Over the last years, the development of antiretroviral Medication supported the prevention of HIV and improved the living conditions of infected patients. Due to evolving antiretroviral resistances, it is necessary to expand the concerning research. The knowledge about expression and regulation of coreceptors is of major value for understanding the HIV pathogenicity.

The aim of this work was to establish a simple and robust polymerase chain reaction (PCR) setup to determine the HIV coreceptor use of both the HIV positive plasma and dried serum spots found in the samples of the seroconverter study and molecular surveillance, respectively. This was done by establishing a subtype generic full-length envelope PCR that is capable to amplify the entire env open reading frame to sequence the viral glycoproteins gp120 and gp41 from human plasma. Furthermore, this work includes an establishment of a high sensitive PCR to amplify the gp120 V3-loop and furthermore sequencing this fragment with next generation sequencing (NGS, Illumina). The exploration of coreceptor tropism was based on the V3-loop fragment and enabled the comparison of coreceptor use to the duration of infection. For this research question, especially for the transition to NGS based methods, two PCR setups were successfully established. A very good detection limit of 10^2 cop./mL was achieved for filter dried material with 500 bp amplicon and a sufficiently well detection limit of 10^3 cop./mL for plasma samples with a 3200 bp amplicon for subtype B reference strain. The NGS sequencing of the full-length env was successful and a derivation of the coreceptor usage was possible up to a minority limit of 3 %. However, the established PCR setup will play an important role for the proportion calculation of transferred X4-tropic viruses. The use of maraviroc as coreceptor-antagonist for treatment of HIV-1 infections emphasises the importance of an attentive clinical monitoring of the virological answer of patients under treatment.

7. Anhang

Tab. 14 Übersichtstabelle der PCR Ergebnisse und des Korezeptorgebrauchs

Scout	Viruslast	PCR			Sanger		NGS					
		Env-1	Env-2	Env-3	FPR in %	Korezeptor	FPR in %	Korezeptor	FPR in %	Korezeptor	FPR in %	Korezeptor
							GW 3%		GW 10%		GW 20%	
03-00170	3,80E+03		x	x	6,9	R5X4	-	-	-	-	-	-
03-00253	4,50E+04	x	x	x	6,9	R5X4	-	-	6,9	R5X4	6,9	R5X4
04-00462	1,20E+06	x	x	x	3,2	CXCR4	3,9	CXCR4	3,8	CXCR4	3,2	CXCR4
05-00605	1,60E+04		x		-	-	-	-	-	-	-	-
05-01219	1,67E+04		x	x	10,2	R5X4	-	-	-	-	-	-
06-00038	1,50E+05	x	x	x	2,6	CXCR4	2,5	CXCR4	2,6	CXCR4	2,6	CXCR4
06-00060	2,30E+04	x	x	x	13,4	R5X4	18,2	CCR5	13,4	R5X4	13,4	R5X4
06-00184	3,45E+03	x	x		-	-	-	-	-	-	-	-
06-00279	1,20E+04		x	x	1,8	CXCR4	-	-	-	-	-	-
06-00366	3,44E+04	x	x	x	23,6	CCR5	23,6	CCR5	23,6	CCR5	23,6	CCR5
06-00677	7,90E+04		x	x	6,8	R5X4	-	-	-	-	-	-
06-00842	2,80E+05	x	x	x	-	-	7,8	R5X4	7,8	R5X4	6,8	R5X4
07-00229	9,15E+03	x	x	x	3,4	CXCR4	3,4	CXCR4	3,4	CXCR4	3,4	CXCR4
07-00251	4,76E+04	x	x	x	-	-	6,7	R5X4	6,8	R5X4	6,9	R5X4
07-00609	1,60E+03	x	x		-	-	31,7	CCR5	31,7	CCR5	31,7	CCR5
07-00838	1,20E+04	x	x	x	2,1	CXCR4	2,1	CXCR4	2,1	CXCR4	2,1	CXCR4
07-00868	2,33E+04	x	x	x	28,8	CCR5	28,8	CCR5	28,8	CCR5	28,8	CCR5
07-01095	1,70E+04	x	x	x	7,8	R5X4	7,8	R5X4	7,8	R5X4	7,8	R5X4
07-01180	2,50E+02				-	-	-	-	-	-	-	-
08-00282	1,41E+04		x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
08-00425	6,09E+02	x			-	-	8,5	R5X4	8,5	R5X4	8,5	R5X4
08-03401	2,18E+05	x	x	x	34,6	CCR5	49,7	CCR5	34,6	CCR5	34,6	CCR5
08-03488	2,88E+03	x	x	x	8,5	R5X4	8,5	R5X4	8,5	R5X4	8,5	R5X4
08-03658	3,60E+03		x	x	0	CXCR4	-	-	-	-	-	-
08-04005	2,50E+05	x	x	x	-	-	7,8	R5X4	7,8	R5X4	7,8	R5X4

09-00977	2,52E+04	x	x	x	28,2	CCR5	55,1	CCR5	34,9	CCR5	21	CCR5
09-02886	7,48E+04	x	x	x	2,8	CXCR4	2,7	CXCR4	2,7	CXCR4	2,7	CXCR4
09-03252	7,11E+04	x	x	x	68,6	CCR5	82,4	CCR5	68,6	CCR5	68,6	CCR5
10-01532	4,18E+04	x	x	x	13	R5X4	7,4	R5X4	7,4	R5X4	4,6	CXCR4
11-00697	5,17E+04	x	x	x	6,9	R5X4	6,8	R5X4	6,8	R5X4	6,8	R5X4
11-03050	5,36E+04	x	x	x	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4
11-03356	2,62E+04	x	x	x	87	CCR5	85,9	CCR5	85,9	CCR5	85,9	CCR5
11-03459	7,07E+06	x	x	x	2,6	CXCR4	5	R5X4	5	R5X4	2,6	CXCR4
12-01693	6,20E+04	x	x	x	14,3	R5X4	0	CXCR4	0	CXCR4	41,6	CCR5
12-04096	2,60E+04		x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
13-00107	4,08E+04	x	x	x	95,8	CCR5	92,2	CCR5	92,2	CCR5	92,2	CCR5
14-00227	1,20E+04		x	x	98	CCR5	-	-	-	-	-	-
14-01568	2,25E+04	x	x	x	15,6	CCR5	15,6	CCR5	15,6	CCR5	15,6	CCR5
14-03090	1,00E+07	x	x	x	75,3	CCR5	0	CXCR4	0	CXCR4	75,3	CCR5
14-03658	3,71E+03	x	x		-	-	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4	1,7	CXCR4
15-01671	7,54E+04	x	x		-	-	10,5	R5X4	10,5	R5X4	10,5	R5X4
16-00815	1,91E+07	x	x	x	41,3	CCR5	0	CXCR4	0	CXCR4	41,3	CCR5
17-02270	2,04E+05		x	x	6,7	R5X4	-	-	-	-	-	-
17-02984	1,99E+06	x	x	x	55,4	CCR5	55,4	CCR5	55,4	CCR5	55,4	CCR5

8. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe des FG 18 unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Bannert des Robert Koch-Instituts bedanken.

Ein besonders großer Dank geht an Stefan Fiedler, der mich die gesamte Zeit bei jeglichen Fragen und Problemen sehr kompetent unterstützt und beraten hat. Aber auch Prof. Dr. Norbert Bannert, Dr. Andrea Hauser, Dr. Karolin Meixenberger, Dr. Patrycja Machnowska, Britta Altmann, Sabrina Neumann, Carina Feldle, Julian Heinze, Hanno von Spreckelsen und Ewelina Caspers unterstützten mich sehr während meines Aufenthalts am Robert Koch-Instituts.

9. Literaturverzeichnis

- Balasubramaniam, M. & Freed, E.O. (2011). New Insights into HIV Assembly and Trafficking. *Physiology*, 26(4), pp.236–251.
- Bieniasz, P. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, 344(1), pp.55-63.
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), pp.1925-1930.
- Braun, P., Knechten H. (2015). HIV-1 Resistenz und Tropismus. *HIV Leitfaden*. URL: <https://www.hivleitfaden.de/cms/index.asp?inst=hivleitfaden&snr=2342>, Zugriff am 06.08.2018.
- Bour, S., Geleziunas, R., & Wainberg, M.A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59(1), pp.63-93.
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology*, 81(19), pp.10209-10219.
- Caffrey, M. (2001). Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: Insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease*, 1536(2-3), pp.116-122.
- Campbell, S. & Vogt, V.M. (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Virology*, 69(10), pp.6487-6497.
- Centers for Disease Control (CDC). (1982). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 31(37), 507–8, 513–4. URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001163.htm>, Zugriff am 20.06.2018.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981a). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 30(25), pp.305–308.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981b). Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) --United States. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 31(37), 507-508,513-514.
- Chook et al., 2015. Molecular Detection of HIV-1 Subtype B, CRF01_AE, CRF sub (33)01B, and Newly Emerging Recombinant Lineages in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), pp.507–512.

-
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C. and Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), pp.343-346.
- Coffin, J., Hughes, S., & Varmus, H. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- De Jong, J. J., Goudsmit, J., Keulen, W., Klaver, B., Krone, W., Tersmette, M., & De Ronde, A. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *Journal of virology*, 66(2), pp.757-765.
- Foster, C., Kaye, S., Smith, C., & Mackie, N. E. (2015). HIV-1 co-receptor tropism and disease progression in children and young adults with perinatally acquired HIV-1 infection. The HICCUP Study. *Journal of virus eradication*, 1(3), p.173.
- Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, pp.1–25.
- Freed, E. (2001). HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1), pp.13-33.
- Gao, F. et al. (1992). Human infection by genetically diverse SIVsm- related HIV-2 in West Africa. *Nature* 358, pp. 495–499.
- Gao, F. et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), pp.436–41.
- Gelderblom, H., Özel, R., & Pauli, M. (1989). Morphogenesis and morphology of HIV structure-function relations. *Archives of Virology*, 106(1), pp.1-13
- Gendelman, H.E. et al. (1989). The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS*, 3(8), pp.475–496.
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), pp.182-192.
- Herschhorn, A., & Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), pp.2717-2747.
- International Committee on Taxonomy of Virus (2017). ICTV Taxonomy history: Lentivirus. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, Zugriff am 04.07.2018.
- Julien, J.-P. et al. (2013). Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), pp.1477–83.
- Klaver, B., Berkhout, B., & Other departments. (1994). Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 68(6), pp.3830-3840.

- Kosakovsky Pond, S. L., & Smith, D. M. (2009). Are All Subtypes Created Equal? The Effectiveness of Antiretroviral Therapy against Non—Subtype B HIV-1., pp.1306-1309.
- Leonard, C., Spellman, M., Riddle, L., Harris, R., Thomas, J., & Gregory, T. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), pp.10373-10382.
- Lu, M., Blackow, S. & Kim, P. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Struct. Biol.* 2, pp.1075–1082.
- Malani, P. (2016). JAMA PATIENT PAGE. Human Immunodeficiency Virus. *JAMA*, 316(2), p.238.
- Mallery, S., Pei, P., Landwehr, D., Clark, C., Bradburn, J., Ness, G., & Robertson, F. (2004). Implications for oxidative and nitrative stress in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Carcinogenesis*, 25(4), pp.597-603.
- Montagnier, L. (2002). Historical essay. A history of HIV discovery. *Science* 298, pp.1727–1728.
- Moulard, M. & Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1469(3), pp.121-132.
- Nettles, R. E. et al. (2012). Pharmacodynamics, safety, and pharmacokinetics of BMS-663068, an oral HIV-1 attachment inhibitor in HIV-1-infected subjects. (HIV/AIDS) (Report). *Journal of Infectious Diseases*, 206(7), pp.1002–1011.
- Plantier, J.-C. et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), pp.871–2.
- Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., & Trono, D. (1999). The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: A paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunological Reviews*, 168, pp.51-63.
- Rambaut, A. et al. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(1), pp.52–61.
- Rieder, P., Joos, B., Scherrer, A. U., Kuster, H., Braun, D., Grube, C., ... & Böni, J. (2011). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) diversity and tropism in 145 patients with primary HIV-1 infection. *Clinical infectious diseases*, 53(12), pp.1271-1279.
- Riemenschneider, M., Cashin, K.Y., Budeus, B., Sierra, S., Shirvani-Dastgerdi, E., Bayanolhagh, S., Kaiser, R., Gorry, P.R. and Heider, D. (2016). Genotypic prediction of co-receptor tropism of HIV-1 subtypes a and C. *Scientific reports*, 6, p.24883.
- Roberts, J., Bebenek, K., Kunkel, T. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4882), pp.1171-3.

-
- Schuitemaker, H., van't Wout, A. B., & Lusso, P. (2011). Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *Journal of translational medicine*, 9(1), p.5.
- Sharp, P., Robertson, D., & Hahn, B. (1995). Cross-Species Transmission and Recombination of 'AIDS' Viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 349(1327), pp.41-47.
- Temin, H. M., (1993). Retrovirus variation and reverse transcription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), pp.6900-6903.
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., Gottlinger, H., & Goettlinger, Y. (2009). The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society Transactions*, 37(1), pp.181-184.
- Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens, and immunogens. *Science (Washington)*, 280(5371), pp.1884-1888.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich,

Jennifer	Ruffert	
_____	_____	_____
Vorname	Name	Matrikelnummer
_____	_____	
geboren am	geboren in	,

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Berlin, 24.08.2018

Ort, Datum

Unterschrift