Hochschule Zittau Görlitz

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaft

Bachelorarbeit

# Etablierung und Validierung einer HIV-1-spezifischen *int* RT-PCR zur genotypischen Resistenzbestimmung von HIV gegenüber Integrase Inhibitoren

von: Stefan Fiedler

geboren am 12.10.1984 in Görlitz

Studiengang: Biotechnologie

eingereicht: 31.01.2010

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Annett Fuchs (Hochschule Zittau Görlitz)

Angefertigt im Robert Koch-Institut, Berlin

In der Projektgruppe HIV Variabilität und Molekulare Epidemiologie unter Leitung und Betreuung von Dr. rer. nat. Claudia Kücherer.

## INHALTSVERZEICHNIS


**1 EINLEITUNG ..... 5**

**1.1 Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ..... 5**

1.1.1 Hintergrund ..... 5

1.1.2 Epidemiologie ..... 5

1.1.3 Genetische Klassifizierung von HIV ..... 7

1.1.4 Morphologie und Genom von HIV ..... 7

1.1.5 *pol*-Genprodukte ..... 9

1.1.6 Replikationszyklus von HIV ..... 11

1.1.7 Natürlicher Verlauf einer HIV-Infektion ..... 14

**1.2 Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion ..... 15**

1.2.1 Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren ..... 16

1.2.2 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren ..... 16

1.2.3 Protease-Inhibitoren ..... 16

1.2.4 Fusions-Inhibitoren ..... 17

1.2.5 Korezeptor-Antagonisten ..... 17

1.2.6 Integrase-Inhibitoren ..... 17

**1.3 Entstehung und Folgen resistenter HIV ..... 17**

1.3.1 Auftreten von Resistenzen ohne Therapie ..... 18

1.3.2 Auftreten von Resistenzen unter suboptimaler HAART ..... 18

1.3.3 Genotypische Resistenzbestimmung ..... 19

**1.4 Resistenzmechanismen ..... 19**

1.4.1 Resistenz gegen NRTI ..... 19

1.4.2 Resistenz gegen NNRTI ..... 20

1.4.3 Resistenz gegen Integrase-Inhibitoren ..... 20

**1.5 Ziel der Arbeit ..... 22**

**2 MATERIAL UND METHODEN ..... 23**

**2.1 Material ..... 23**

2.1.1 HIV-1 Subtyp Referenzpanel (Virusisolate) ..... 24

2.1.2 Patientenpanel ..... 25

2.1.3 Externe Qualitätskontrolle ..... 27

**2.2 Methoden ..... 27**
2.2.1 Herstellung des Konzentrationsstandards ..... 27
2.2.2 RNA-Extraktion ..... 28
2.2.3 *int* RT-PCR ..... 28
2.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese ..... 30
2.2.5 Aufreinigung von DNA ..... 31
2.2.6 TaqMan Real-time RT-PCR ..... 31
2.2.7 Sequenzanalyse ..... 32
2.2.8 Sequenzauswertung ..... 33
2.2.9 Subtypbestimmung ..... 34
2.2.10 Sequenzbewertung ..... 36

**3 ERGEBNISSE ..... 37**

**3.1 Sensitivität für Subtyp B ..... 37**

**3.2 Subtyp-generische Amplifikation der HIV-1 Subtypen ..... 38**

**3.3 Überprüfung des Subtyps der Integrase-Sequenz der Subtyp-Referenzviren ..... 41**

**3.4 Validierung der *int* RT-PCR anhand von Patientenproben aus der HIV-1 Serokonverterstudie ..... 43**

**3.5 Externe Qualitätskontrolle zur Durchführung der *int* RT-PCR ..... 50**

**4 DISKUSSION ..... 52**

**4.1 Sensitivität der *int* RT-PCR ..... 52**

**4.2 Subtyp-generische Amplifikation der *int*-Region mit unterschiedlicher Sensitivität ..... 53**

**4.3 Subtypbestimmung anhand der Integrasesequenzen ..... 54**

**4.4 Validierung der *int* RT-PCR an einem Patientenpanel ..... 55**

**4.5 Analyse der Resistenzmutationen gegen Integrase-Inhibitoren ..... 55**

**4.6 Subtyp-spezifische Polymorphismen in der Integrase ..... 56**

**4.7 Ausblick ..... 56**

**5 ZUSAMMENFASSUNG ..... 58**

**6 LITERATURVERZEICHNIS ..... 59**

**7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... 65**

**8 ERKLÄRUNG ..... 67**

**9 APPENDIX ..... 68**

**10 DANKSAGUNG ..... 76**

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

### 1.1.1 Hintergrund

Im Jahre 1981 wurden gehäuft tödlich verlaufenden Krankheiten unter homosexuellen Männern in den USA beobachtet, die meist mit Kaposi-Sarkom oder Lungenentzündung assoziiert waren. Nach kurzer Zeit wurde bei diesen Krankheitsbildern eine erworbene Immunschwäche diagnostiziert (Masur *et al.* 1981, Gottlieb *et al*. 1981). 1983 beschrieb der US-Amerikaner Robert Gallo und parallel zu ihm der Franzose Luc Montagnier ein Retrovirus, das heute als humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (*Human Immunodeficiency Virustype 1*, HIV-1) bekannt ist. Nach kurzer Zeit konnte HIV als Verursacher von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome)* aufgedeckt werden (Gallo *et al.* 1984). Derzeitige Forschungsergebnisse unterstützen die Hypothese dass HIV-1 wahrscheinlich durch Zoonose vom Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde (Gao *et al.* 1999). 1986 konnte in Portugal ein zweites AIDS auslösendes Virus, hauptsächlich in Patienten aus West Afrika und dem Senegal, entdeckt werden. Dieses Virus mit einer Divergenz von >55% zu HIV-1 wurde später als HIV Typ 2 (HIV-2) beschrieben (Clavel *et al.* 1986, Coffin *et al.* 1986).

### 1.1.2 Epidemiologie

UNAIDS schätzt dass ca. 33 Millionen Menschen Ende 2008 mit HIV lebten. Davon kamen 22 Millionen betroffene Menschen 2008 aus der Sub-Sahararegion (UNAIDS, *AIDS epidemic update*, November 2009). Die Fallzahlen stabilisierten sich langsam auf einem hohen Niveau (siehe Abb.1). Die Rate der Neuinfektionen ging von 3 Millionen im Jahre 2001 auf 2,7 Millionen 2007 zurück. Weltweit starben im Jahr 2007 ca. 2 Millionen Menschen an HIV. Von diesen waren ca. 270.000 Kinder (jünger als 15 Jahre). 90% der Kinder mit einer HIV-Neuinfektion kamen dabei aus der Sub-Sahararegion (*Report on the Global AIDS epidemic*, UNAIDS 2008). In Deutschland leben derzeit ca. 67000 Menschen mit HIV/AIDS. Die Zahl der HIV Erstdiagnosen in Deutschland lag 2009 bei rund 3000. (Epidemiologisches Bulletin, 30.11.2009/Nr. 48, Robert Koch-Institut).

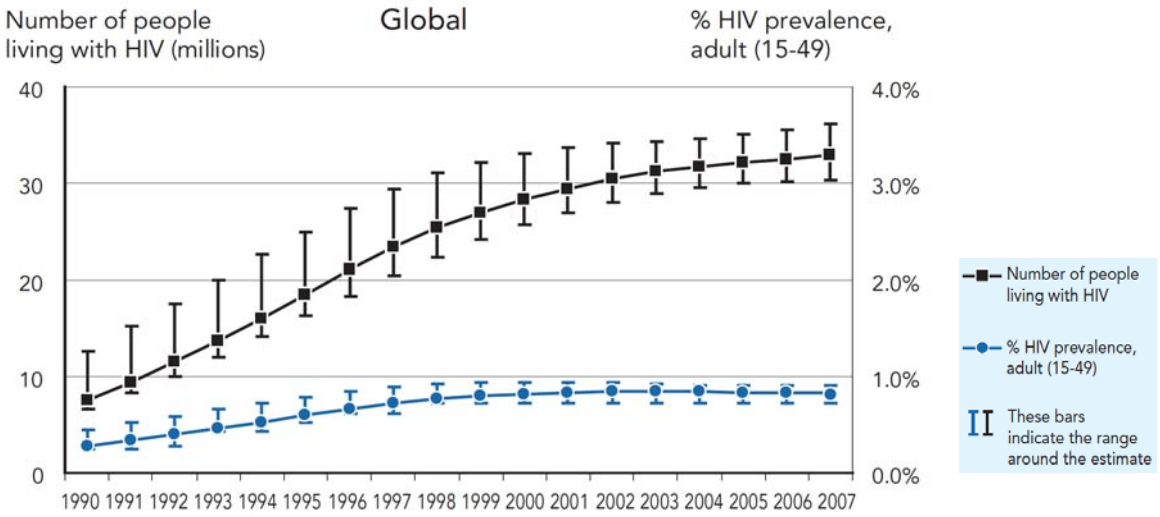


**Abb.1** **Geschätzte Infektionszahlen und Prävalenz bei Erwachsenen**
Global 1990 bis 2007, *Report on the Global AIDS epidemic*, UNAIDS 2008

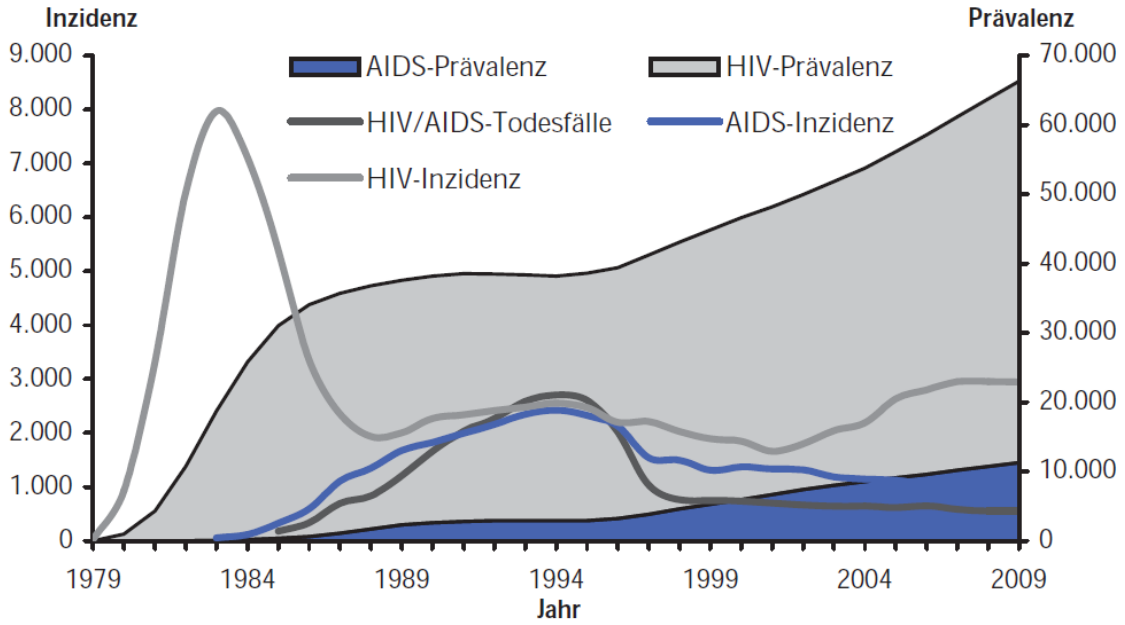


**Abb.2** **Geschätzte HIV/AIDS-Inzidenz, -Prävalenz und Todesfälle in Deutschland**
Ende 2009, Epidemiologisches Bulletin, 30.11.2009/Nr. 48, Robert Koch-Institut

### 1.1.3 Genetische Klassifizierung von HIV

Das humane Immundefizienz Virus gehört in der Familie der Retroviridae zur Unterfamilie der *Orthoretrovirinae* und wird in die Gattung Lentiviren eingeordnet (Faquet *et al.* 2005). Retroviren besitzen zwei einzelsträngige RNA-Genome, die Plusstrangorientiert sind und bei der Virusreplikation mit der Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. Anhand von phylogenetischen Analysen wird zwischen den beiden Typen HIV-1 und HIV-2 unterschieden, wobei HIV-1 ubiquitär auftritt und das Verbreitungsgebiet von HIV-2 hauptsächlich in Westafrika liegt (Kanki *et al.* 1993). HIV-1 wird weitergehend unterteilt in die Gruppen M (*major*), O (*outlier*) und N (*non-M*, *non-O*). Die Gruppe M ist zusätzlich in die Subtypen A bis D, F bis K und 43 weitere rekombinanten Formen CRF (*circulating recombinant forms*) untergliedert (www.hiv.lanl.gov/content/sequenz/HIV/CRFs.html). Zurzeit wird die Einführung einer neuen Gruppe P diskutiert, die in einer aus Kamerun stammenden Patientin entdeckt wurde (Plantier *et al.* 2009).

### 1.1.4 Morphologie und Genom von HIV

Ein infektiöses HIV-1 Partikel besitzt einen Durchmesser von 100 -120 nm und ist von einer Lipoproteinhülle umgeben. Auf dieser Hüllmembran befinden sich ca. 70 *env*-Glykoproteinkomplexe aus einem Transmembranteil gp41 (Glykoprotein 41) und einem externen Anteil gp120. Dabei spielt gp120 eine entscheidende Rolle in der Erkennung spezifischer Rezeptoren auf der Zielzelle. Die innere Oberfläche der Hüllmembran ist mit Matrixproteinen (p17) besetzt. Das von der Membran umhüllte, konische Capsid ist aufgebaut aus p24-Proteinen (Gelderblom *et al.* 1987) und enthält die beiden einzelsträngigen RNA-Genomkopien sowie die Enzyme Integrase (p32), Protease (p12) und die Reverse Transkriptase/RNaseH (p51/p66). Die Morphologie eines HIV-1 Partikels ist in Abb.3 dargestellt.

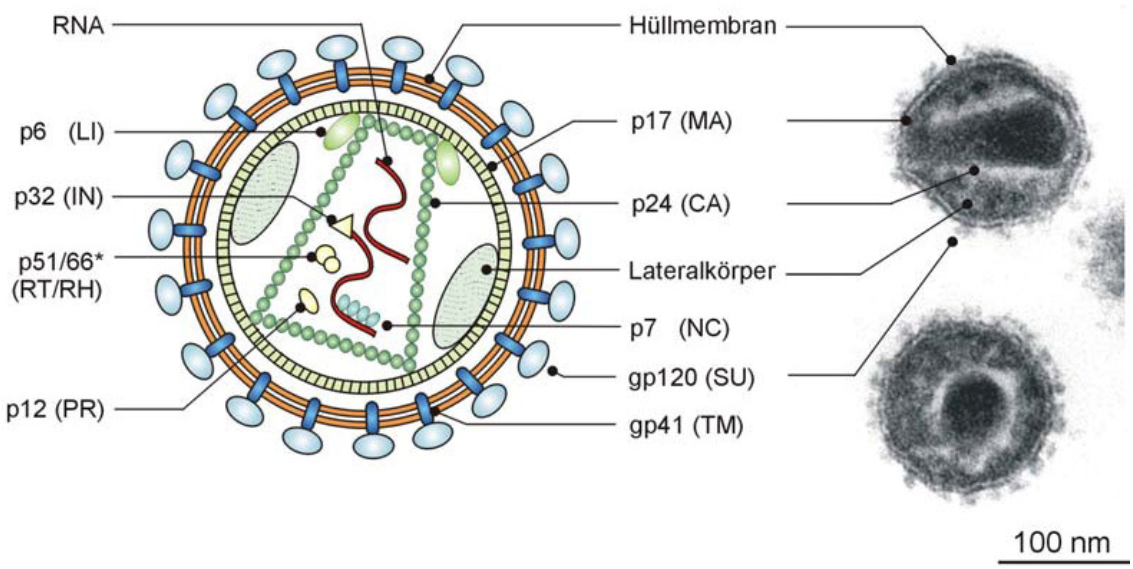


**Abb.3 Schematische und elektronenmikrospopische Darstellung eines HIV-1 Partikels.**
Hüllmembran mit externem (gp120) und transmembranem (gp41) Glykoprotein, gruppenspezifische Antigene Link-Protein (p6), Matrixprotein (p17), Capsidprotein (p24) und Nukleocapsidprotein (p7), Enzyme Integrase (p32), Heterodimere RT p51/RTp66 (ind.RNaseH) und Protease (p12) sowie RNA und Lateralkörper. (Elektronenmikroskopische Aufnahme Gelderblom et al. 1987)

Das gesamte ca. 9,5 kB große HIV-1 RNA Genom kodiert neun Proteine in drei offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF), die von regulatorischen repetitiven Sequenzen flankiert sind (Abb.4). Die 5'-LTR-Region (*long terminal repeat*) fungiert als Promoter/Enhancer-Region, welche die Genexpression von HIV-1 steuert. In der 3'-LTR-Region wird die Transkription terminiert. Aufgrund der überlappenden Anordnung der offenen Leserahmen können mehrere Proteine von denselben Sequenzabschnitten abgelesen werden. Durch diese Verschachtelung wird die Komplexität des Virus bei gleichbleibender Größe erhöht. Das HIV-1 Genom beinhaltet die für Retroviren typischen offenen Leserahmen *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), welche die Strukturproteine und Enzyme kodieren, sowie die regulatorischen (*Tat,Rev*) und akzessorischen (*Vif, Vpr, Vpu, Nef*) Proteine.

Zu den Strukturproteinen zählen die externen und transmembranen Glykoproteine (gp120 und gp41), die vom *env*-ORF kodiert werden, sowie die gruppen-spezifischen Antigene (*gag*): das Matrixprotein (p17), das Capsidprotein (p24), das Nukleokapsidprotein (p7) und Link-Protein (p6). Die Transkription der viralen DNA stimulieren die Regulatorproteine *Tat* (*transactivator of transcription*) und *Rev* (*regulator of expression*). Zudem fördern sie den Export der RNA vom Nukleus in das Zytoplasma

und unterstützen die Translation. *Nef* (*negativ factor*), *Vif* (*virion infectivity factor*), *Vpr* (*viral protein R*) und *Vpu* (*viral protein U*) gehören zu den akzessorischen Proteinen. Diese sind im Gegensatz zu den regulatorischen Proteinen bei der *in vitro* Virusreplikation nicht essentiell, steigern jedoch die Infektiösität des Partikels (Cohen *et al*. 1996). Die Enzyme Protease (p12), Reverse Transkriptase/RNaseH (p51/p66) und Integrase (p32) werden vom *pol*-ORF kodiert.

### 1.1.5 *pol*-Genprodukte

Auf der pol-Region werden drei Proteine codiert, die essentielle für den Replikationszyklus sind (Abb.4).

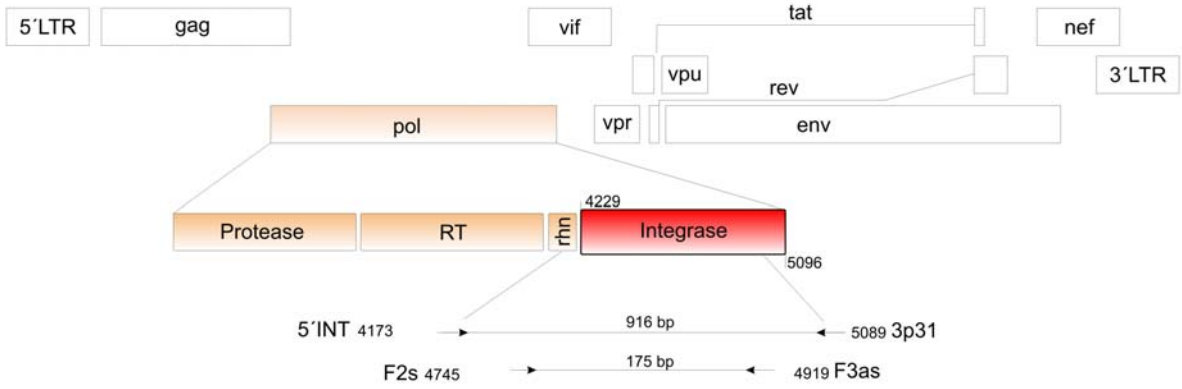


**Abb.4 Schematischer Aufbau *pol*-Region**
Position der PCR- und Sequenzierprimer, Referenz HXB2 (Acc. No. AF 324493)

***Protease***

Die virale Protease spaltet sich während der Reifung der Viruspartikel autokatalytisch aus dem *Gag/Pol*-Vorläuferprotein heraus und prozessiert anschließend aus dem Vorläuferprotein auch die Reverse Transkriptase, die Integrase und die *Gag*-Vorläuferproteine in funktionale Proteine (Kohl *et al.* 1988, Wan *et al*. 1996). Die dimere Protease von HIV-1 gehört zur Familie der Aspartatproteasen.

***Reverse Transkriptase***

Die virale Reverse Transkriptase schreibt einzelsträngige RNA über ein RNA/DNA-Intermediat in doppelsträngige DNA um. Hierfür werden drei funktionelle Aktivitäten des Enzymes benötigt: Die RNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert anhand der viralen RNA ein RNA/DNA-Hybrid (Baltimore *et al*. 1970), die RibonukleaseH (RNaseH) degradiert spezifisch den RNA-Anteil in dem entstandenen Hybrid (Tanese *et al*.

1988) und die DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert mit Hilfe der DNA-Matrize den Zweitstrang der proviralen DNA. Die Reverse Transkriptase ist hierbei als Heterodimer aktiv, wobei das 51 kDa Monomer durch proteolytische Abspaltung des Carboxyterminus des 66 kDa Monomers entsteht und daher über keine RNaseH-Aktivität verfügt. (Le Grice *et al*. 1991).

***Integrase***

Die Integrase ist für die Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom verantwortlich. Hierfür verfügt sie über eine Zinkfinger-Endonukleaseaktivität, um die doppelsträngige genomische DNA zu schneiden. Sie kann außerdem je ein Basenpaar von den Enden der LTR abtrennen um neue 3´-Hydroxylenden zu schaffen, die für den Einbau in die Wirts-DNA erforderlich sind. Die Integrase ist am Aufbau eines Präintegrationskomplexes beteiligt, wodurch das Einschleusen in den Zellkern erst ermöglicht wird. Sie besitzt zudem eine Ligase-Aktivität, um die Insertion in das Wirts-Genom zu ermöglichen (Panganiban und Temin 1984, Alian *et al*. 2009). Während des Integrationsprozesses kommt die Integrase in Dimer- und Tetramerstruktur vor (siehe Abb.5). Ein einzelnes Integraseprotein besitzt eine Größe von 32 kDa (Asante-Appiah *et al.* 1999, Esposito und Craigie 1999).

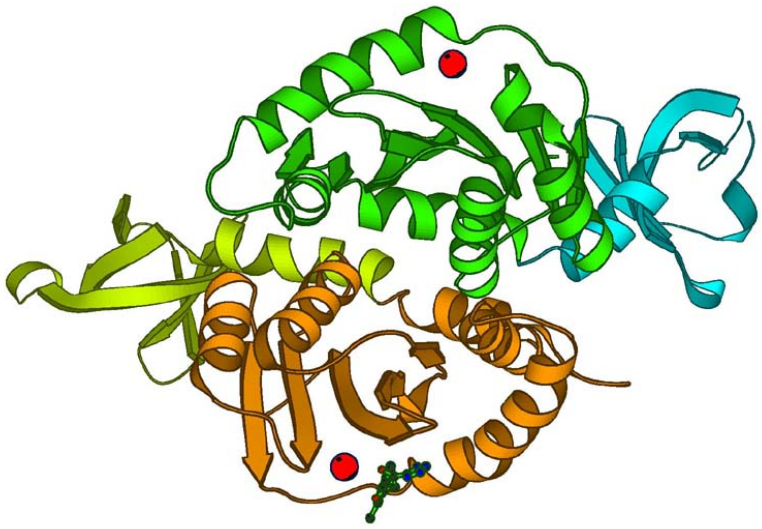

**Abb.5 Model HIV-1 Integrase**
Mögliche Dimerstruktur, grün und orange katalytischer Kern, gelb und blau C-Terminale Domäne, rot Magnesiumion (Abbildung M. Briggs, Dept. Of Biology & Biochemistry, Huston TX, adrik.bchs.uh.edu/gallery.html)

Ihre Aminosäurearchitektur weist drei Subdomänen auf (Abb.6). Die N-terminale Subdomäne, mit ihrem Zinkfinger „H-H C-C"-Motiv, ist für das Binden an die genomische DNA sowie das Schneiden der DNA verantwortlich (Lodi *et al.* 1995). Die zentrale Subdomäne (*catalytic core domain*), welche sich durch die Anwesenheit eines konservierten „D-D-E"-Motives auszeichnet (Kan *et al.* 1991), sorgt für die Ligation der viralen mit der genomischen DNA. Die Aufgabe der C-terminalen Subdomäne konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, es wird allerdings vermutet, dass sie im Zusammenhang mit der unspezifischen Bindung an die genomische DNA steht (Katzman und Sudol 1995; Jenkins *et al.* 1997).

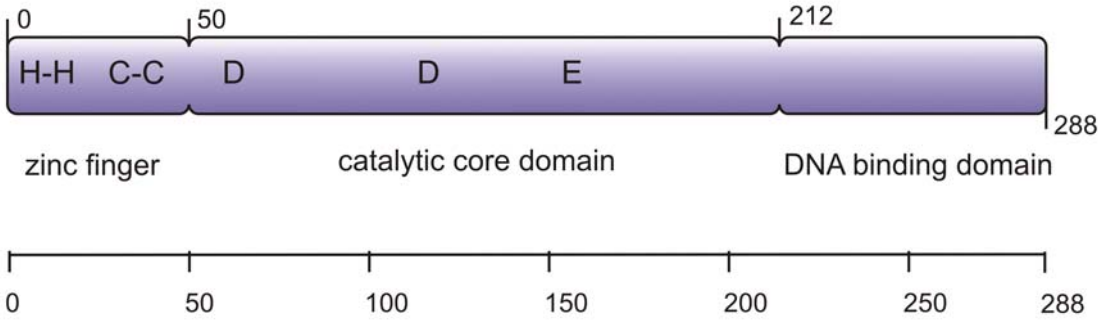


**Abb.6 Funktionale Domänen der HIV-1 Integrase**
Aminosäurenposition von C- nach N-Terminal

### 1.1.6 Replikationszyklus von HIV

Der Replikationszyklus von HIV (Abb.7) beginnt mit dem Anhaften des Virus an die Wirtszelle (*attachment*). Dabei bindet das virale Oberflächenglykoprotein gp120 an das monomere zelluläre Glykoprotein CD4 (*Cluster of Differentiation* 4). T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen sowie Dendritische Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems tragen dieses Oberflächenmolekül CD4 (Stebbing *et al*. 2004). Durch Konformationsänderung im gp120 kommt es während der Bindung zur Interaktion mit einem Korezeptor. Vorwiegend verwendet HIV-1 die Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 (Deng *et al.* 1996). Eine folgende Konformationsänderung führt zur Insertion des hydrophoben Aminoterminus des membranständigen gp41 in die Zellmembran der Wirtszelle. Dieser Schritt löst die Fusion von Virushülle und Zellmembran aus und führt zum Einschleusen des Viruskernpartikels in das Zytoplasma (*uncoating*). Zu der Theorie des „*Attachment*" gibt es neuere Ergebnisse, die eine Fusion in die Wirtszelle erst nach erfolgter Endozytose beschreibt (Miyauchi *et al*. 2008). Nach er-

folgter Fusion sowie „*uncoating*“ kommt es zu einem Umschreiben der viralen RNA in provirale cDNA durch die Reverse Transkriptase (RT). Da die RT keine Korrekturfunktion für den Einbau fehlgepaarter Basen hat, werden bei der DNA-Synthese der beiden DNA-Stränge mit einer Einbaurate von ca. 1 pro 10.000 Basen nicht komplementäre Basen eingebaut, dadurch ergibt sich eine Mutationsrate von etwa einer Mutation pro Genomkopie (Perelson *et al*. 1996). Einige Mutationen führen zu replikationsdefizienten Viren andere zu replikationskompetenten Viren, wodurch eine Vielzahl eng verwandter Virusvarianten entsteht (virale Quasispezies). Manche Virusvarianten werden durch die Immunantwort des Wirtes eliminiert, andere können diese erfolgreich umgehen.

Nach der reversen Transkription erfolgt die Bindung der Integrase im Zytoplasma an die virale DNA. Hierbei entsteht ein Präintegrationskomplex, indem die virale DNA zirkularisiert ist. In dieser Form wird die virale DNA durch Kernporen in den Zellkern transportiert. Eine weitere Funktion der Integrase ist das Abtrennen von je einem Dinukleotid an beiden LTR-Enden. Es entstehen neue 3´-Hydroxylenden innerhalb des Präintegrationskomplexes. Die reaktiven Hydroxylgruppen sind nukleophil und attackieren durch Umesterung die genomische DNA. Nach dem Schneiden erfolgt der Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom, dabei sorgt die Integrase für das Andocken und die irreversible Bindung. Wirtszelleigene Reperaturenzyme füllen Lücken, die aufgrund des Einbaus entstanden sind. Die integrierte virale DNA liegt nun als sogenanntes Provirus vor (Allan *et al.* 1987).

Nach Stimulation der infizierten Wirtszelle durch Mitogene oder Zytokine wird die Transkription der proviralen DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II aktiviert (Rosen *et al.* 1985). Die früh im Infektionszyklus synthetisierten regulatorischen Proteine *Tat* und *Rev* werden aus dem Zytosol in den Nukleus geschleust und führen hier zur massiven Transkritptionsaktivierung (*Tat*) sowie zur Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNA (*Rev*). Ungespleißte *full-length* HIV-RNA, translatierte Vorläuferproteine von *Gag* und *Pol* akkumulieren und bilden in einem „*self-assembly*“ Prozess das Viruskernpartikel. *Env*-Proteine werden über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zellmembran befördert. Dort kommt es zur Knospung der Partikel von der Wirtszelloberfläche (*budding*) und schließlich zur Reifung der Partikel zu infektiösen Viren durch Spaltung von Vorläuferproteinen mit Hilfe der HIV-Protease (Kaplan *et al.* 1994; Levy 2007).

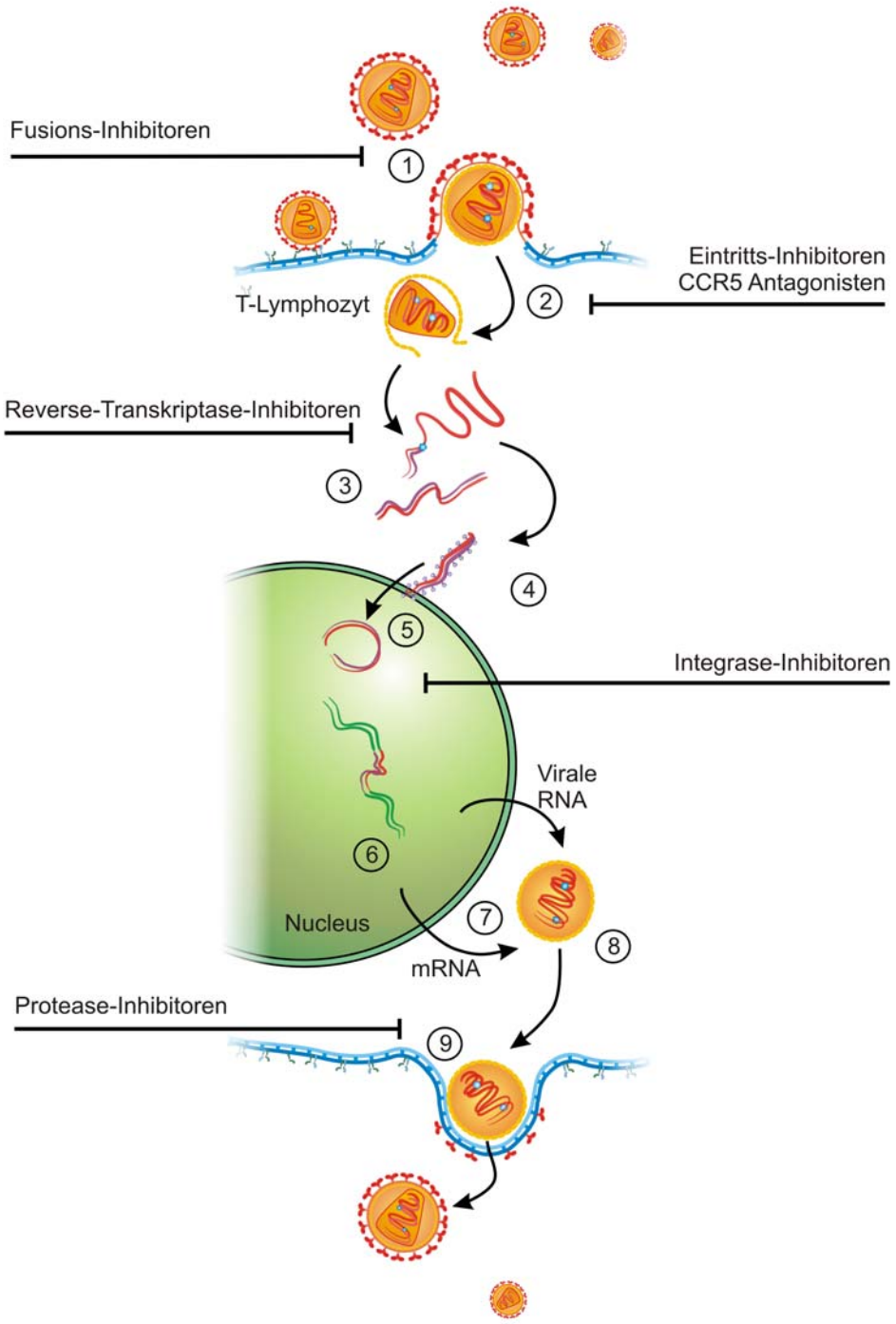


**Abb.7 Replikationsszyklus von HIV mit Angriffsstellen für antiretrovirale Medikamente.**

Die Nummerierung ist wie folgt: 1. Fusion, 2. Einschleusen in das Zytoplasma, 3. Reverse Transkription, 4. Einbinden in einen Präintegrationskomplex, 5. Zirkularisierung, 6. Integration in die genomische DNA, 7. Translation, 8. Aufbau des Kernpartikels, 9. Abschließende Maturation und Knospung. In den Schritten 3 bis 6 sind die Proteine mit der viralen RNA/DNA assoziiert.

### 1.1.7 Natürlicher Verlauf einer HIV-Infektion

Die zeitliche Entwicklung einer HIV-Infektion, gemessen an klinischen- und Laborparametern ohne Intervention durch HAART (*highly active anti-retroviral therapy*), bezeichnet man als natürlichen Verlauf. Das Virus wird durch horizontale Transmission z.B. (sexueller Kontakt, infiziertes Blut in gebrauchten Spritzen, Bluttransfusion) oder vertikale Transmission (während der Geburt, über die Muttermilch) übertragen. Die CDC-Klassifikation (*Centers for Disease Control* 1993) teilt eine HIV-Erkrankung in drei klinische Kategorien ein (siehe Abb.8). Einige Tage bis wenige Wochen nach der Infektion zeigten sich in 30% der Fälle eine kurzfristige, grippeähnliche Symptomatik, die häufig mit Hautausschlag oder Pilzinfektion im Rachenraum assoziiert ist. Diese Phase entspricht der CDC-Kategorie A (Kahn und Walker 1998). Dieses frühe Stadium der Infektion ist durch eine ausgeprägte Virämie gekennzeichnet, bei der es zur Streuung der Viren in Reservoirs sowie zum kurzfristigen Einbruch der $CD4^+$ T-Lymphozyten kommt. Die Viruslast steigt auf mehr als $10^8$ HIV-Genomäquivalente/ml Plasma an, während die Zellzahl der $CD4^+$ T-Lymphozyten auf unter 500 Zellen/ml Blut abfallen kann (Gaines *et al.* 1990). Etwa vier bis zwölf Wochen nach der Infektion erfolgt die Serokonversion (Bildung von Antikörpern). Die Aktivierung des Immunsystems kontrolliert die virale Replikation, so dass die Viruslast auf bis zu 1% des initialen Wertes abfällt. Dabei steigt die CD4-T-Zellzahl auch wieder an, erreicht aber nie mehr den ursprünglichen Wert. Die Höhe dieser Viruslast ist individuell verschieden und stellt einen prognostischen Marker für den weiteren Verlauf der Erkrankung dar. Die folgende chronische Phase oder Latenzphase verläuft klinisch asymptomatisch und dauert in westlichen Ländern in der Regel 8-10 Jahre an (CDC-Kategorie B). In dieser Zeit steigt die Viruslast langsam wieder an, die CD4-Zellzahl sinkt allmählich und das Virus zerstört die lymphatischen Gewebe. Dieser ausgeprägte Immundefekt führt zur Entwicklung des Krankheitsbildes AIDS, das mit opportunistischen Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten oder mit Lymphomen einhergeht (CDC-Kategorie C) und letztendlich den Tod des Erkrankten zur Folge hat (Levy 2007).

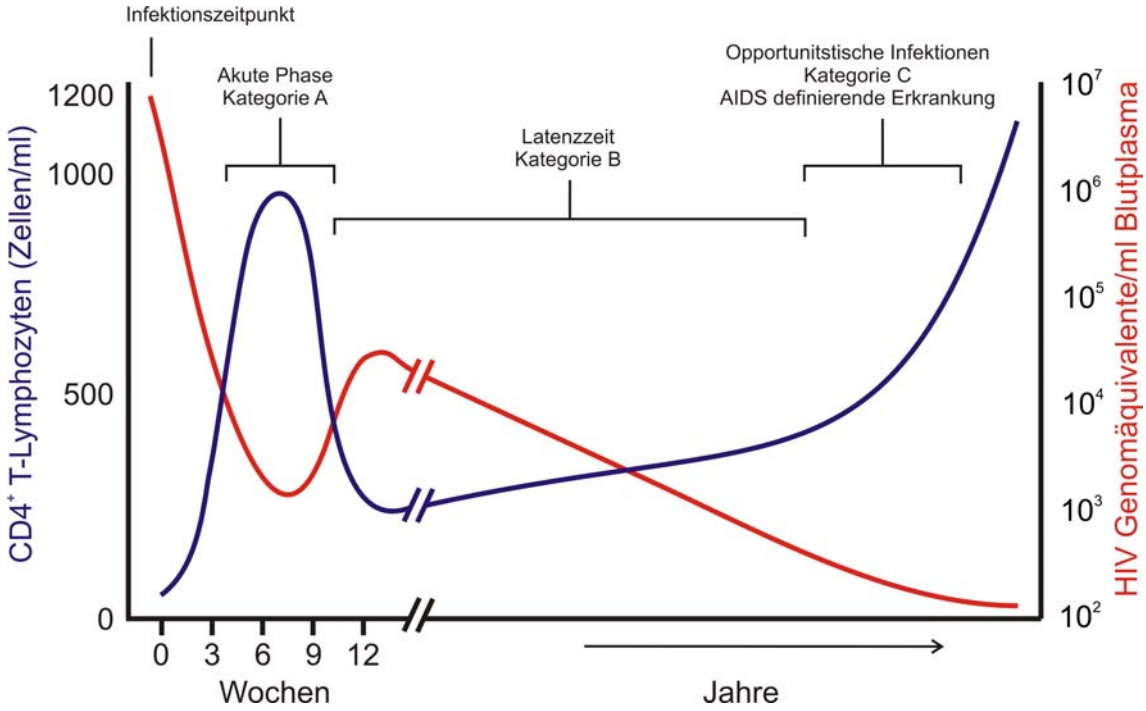


**Abb.8 Schematischer Verlauf einer HIV-Infektion**
CD4+ T-Lymphozyten und HIV-Genomäquivalente/ml Blutplasma in Abhängigkeit der Krankheitsdauer, Querbalken geben die Phase der Infektion an.

## 1.2 Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion

Ziel der antiretroviralen Therapie (ART) ist die Suppression der Virusreplikation, was zu einer Reduktion der Viruslast und einem Wiederanstieg bzw. einer Stabilisierung der CD4-Zellzahl führt. Somit kann der natürliche Verlauf der HIV-Infektion mit der Progression zum Krankheitsbild AIDS verzögert werden. Derzeit stehen in der klinischen Anwendung fünf Wirkstoffklassen antiretroviraler Medikamente zur Therapie zur Verfügung: Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), Protease-Inhibitoren (PI), Eintritts-Inhibitoren (EI), dazu zählen Fusions-Inhibitoren (FI) und CCR5-Antagonisten, und Integrase-Inhibitoren (INI).

Der Erfolg von antiretroviralen Medikamenten wird durch zahlreiche Nebenwirkungen abgeschwächt. Das größte Problem der ART ist jedoch die Ausbildung von medikamentenresistenten Virusvarianten, die zu Therapieversagen führen, daher zu einem Wiederanstieg der Viruslast im peripheren Blutkreislauf. Da die Kombination mehrerer Wirkstoffklassen die virale Replikation effektiver inhibiert als Monotherapien, werden antiretrovirale Medikamente seit 1996 überwiegend in Form von Kombinationsthera-

pien eingesetzt (Hammer *et al.* 1996). Die Resistenzentwicklung wird hierbei verzögert, da dem Virus weniger Möglichkeiten zur Ausbildung von Fluchtvarianten bleiben. Trotzdem gibt es multiresistente Viren. Die als HAART (*highly active anti-retroviral therapy*, hochwirksame antiretrovirale Therapie) bezeichnete Kombinationstherapie aus mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten (meistens zwei NRTI und ein PI oder ein NNRTI) wurde zunehmend zur Behandlung von HIV-1 Infektionen eingesetzt, wodurch ein enormer Rückgang der AIDS-Fallzahlen verzeichnet werden konnte (UNAIDS, 2006) und die Morbidität und Mortalität der HIV-Infektion gesenkt wurde.

### 1.2.1 Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

NRTI sind Nukleosid- oder Nukleotidanaloga mit Modifikation der Ribose, die als alternative Substrate mit physiologischen Nukleotiden um den durch die RT katalysierten Einbau in die wachsende DNA-Kette konkurrieren. Kommt es zum Einbau eines NRTI, erfolgt der Abbruch der Polymerisationsreaktion, da keine freie 3´-Hydroxylgruppe zur Ausbildung der Phosphodiesterbindung zum darauffolgenden Nukleotid zur Verfügung steht (Patel *et al.* 1995).

### 1.2.2 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

NNRTI, deren Zielenzym ebenfalls die RT ist, wurden 1990 erstmals beschrieben und werden seit der Zulassung von Nevirapin (NVP, Viramune®) in Europa im Jahre 1997 eingesetzt. NNRTI binden direkt und nicht-kompetitiv an die Reverse Transkript-ase nahe der Substratbindungsstelle für Nukleotide. Dadurch bildet sich ein Komplex, der die Bindung von Nukleotiden inhibiert und die Polymerisationsgeschwindigkeit des Enzymes stark herabsetzt (Deeks *et al.* 2001).

### 1.2.3 Protease-Inhibitoren

Eine weitere Wirkstoffklasse antiretroviraler Medikamente bilden Proteasinhibitoren, die seit der Zulassung von Saquinavir (SQV, Invirase 500®) im Dezember 1996 zur Behandlung von HIV-Infektionen eigesetzt werden. Die Hemmung der Protease durch Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum führt zur Ausbildung nicht-infektiöser Viruspartikel, da die proteolytische Spaltung des *Gag/Pol*- und *Gag*-Polyproteins ausbleibt.

### 1.2.4 Fusions-Inhibitoren

Im Jahr 2003 erfolgte die Zulassung des Fusionsinhibitores T-20 (Enfuvirtide oder Fuzeon®), dem ersten Vertreter der Fusions-Inhibitoren in der EU. Fusions-Inhibitoren können an unterschiedlichen Stellen den Eintritt des Virus in die Wirtszelle verhindern. Fuzeon® bindet an gp41 und verhindert dadurch die Konformationsänderung, die für die Fusion mit der Wirtszelle notwendig ist.

### 1.2.5 Korezeptor-Antagonisten

Korezeptor-Antagonisten hemmen direkt das Andocken des HIV an die Oberfläche der Zielzellen, indem das zelluläre Protein blockiert wird. Im Sommer 2007 kam der erste Antagonist Maraviroc (Celsentri®) auf den Markt. Seine Wirkung beschränkt sich auf den humanen Korezeptor CCR5 und blockiert nur HIV-Stämme, die ihn nutzen.

### 1.2.6 Integrase-Inhibitoren

Von den Integrase-Inhibitoren, deren Zielenzym die Integrase ist, ist bisher ein Medikament zugelassen worden, Raltegravir (Isentress®, RAL). Es inhibiert den Strangtransfer der viralen DNA in die genomische DNA. Die Zulassung für Raltegravir erfolgte im Dezember 2007 in der EU und ist somit eines der jüngsten Medikamente zur Therapie von HIV. Ein zweites Medikament, Elvitegravir (EVG), befindet sich zurzeit in der Phase III der klinischen Zulassung. Möglicher Vorteil von Integrase-Inhibitoren sind die geringen Nebenwirkungen im Körper aufgrund der Nichtbeeinflussung von körpereigenen Enzymen.

## 1.3 Entstehung und Folgen resistenter HIV

Viren werden als „resistent“ bezeichnet, wenn sie in Anwesenheit eines Inhibitors im Vergleich zum sensitiven Wildtyp einen Wachstumsvorteil aufweisen. Die Analyse resistenter Virusvarianten im Vergleich zum sensitiven Wildtyp führte zur Identifikation von Resistenzmutationen. Durch die hohe Mutationsrate von HIV und dessen Anpassungsfähigkeit an veränderte Umgebungen wird die Entstehung von Resistenzen ermöglicht. Die genetische Variabilität des HIV ist durch die Fehlerrate der viralen RT bedingt (siehe1.1.6). Die hohe Replikationsrate von HIV mit täglich bis zu 10 Milliarden Virus-

partikeln führt zur raschen Entstehung diverser Virusvarianten (Perelson *et al.* 1996). In einem infizierten Individuum liegt daher eine Mischung genetisch verwandter, aber nicht identischer Virusvarianten vor, die als virale Quasispezies bezeichnet werden (Eigen und Biebrich 1988).

Die Nomenklatur für Resistenzmutationen besteht aus der Nennung der Wildtypaminosäure, der Position der ausgetauschten Aminosäure im Enzym und der Nennung der substituierten Aminosäure. So beschreibt zum Beispiel die Mutation M154I auf der Integrase den Austausch von Methionin zu Isoleucin an der Position 154. Auch die Bezeichnung mehrerer unterschiedlicher Aminosäureaustausche an einer Position ist möglich (z.B. M154IV).

### 1.3.1 Auftreten von Resistenzen ohne Therapie

Resistenz-assoziierte Aminosäuresubstitutionen können in therapie-naiven Individuen durch zufällige Mutationsprozesse aufgrund fehlerhafter Virusreplikation auftreten. Replikationskompetente Mutanten verlieren in der Regel an Replikationskompetenz, können jedoch auch nach Übertragung, in Abwesenheit von Selektionsdruck, als minoritäre Variante persistieren (Neifer *et al.* 2006). Als virale Fitness versteht man die Vermehrungs- und Ausbreitungseffizienz. Im Vergleich zum Wildtyp kann eine Virusvariante einen optimaleren oder suboptimaleren Replikationszyklus besitzen und somit eine veränderte Replikationsrate haben. Die Fitness steht somit unter Einfluss aller viralen und wirtsspezifischen Faktoren. Weiterhin können Resistenzmutationen im therapienaiven Patienten vorliegen, sobald eine Infektion mit einer resistenten Variante erfolgte, die von einer Person mit Therapieversagen kam.

### 1.3.2 Auftreten von Resistenzen unter suboptimaler HAART

Wird auf die virale Quasispezies eines Patienten durch Medikation Selektionsdruck ausgeübt, kommt es unter optimaler HAART zur Inhibition der Virusreplikation und zum Abfall der Viruslast. Suboptimale HAART dagegen führt zu persistierender Virusreplikation, wodurch Viren mit resistenz-assoziierten Mutationen selektiert werden oder neu entstehen. Resistenzmutationen akkumulieren und die Viruslast steigt wieder an (Therapieversagen). Es wird unterschieden zwischen Primär- oder Hauptmutationen, die für das Auftreten der phänotypischen Resistenz verantwortlich sind, und sekundären oder minoritären Resistenzmutationen, die zum Teil auch Verluste der viralen Fitness

kompensieren können (Hirsch *et al.* 1998). Resistente Viren replizieren unter Selektionsdruck effektiver als der sensitive Wildtyp und überwachsen schließlich die Wildtypvariante. Weiterhin kann eine suboptimale antiretrovirale Suppression eine residuelle Replikation von Proviren in ruhenden $CD4^+$ T-Lymphozyten ermöglichen, die zur Neuentstehung und Selektion resistenter Viren führt (Wong *et al.* 1997)

### 1.3.3 Genotypische Resistenzbestimmung

Die Resistenz von HIV gegenüber antiretroviralen Medikamenten lässt sich genotypisch und phänotypisch bestimmen (Wilson 2003). Beide Methoden beruhen auf der Analyse der resistenz-assoziierten Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz für Protease, Reverse Transkriptase und Integrase.

Bei der genotypischen Resistenzbestimmung wird das *pol*-ORF amplifiziert, sequenziert und anhand des Resistenzmusters der Virusstämme ein Phänotyp vorhergesagt. Diese Vorhersage basiert auf korrelierten Geno- und Phänotypisierungen, die in Datenbanken zusammengefasst und unter Einbeziehung des klinischen Ansprechens der Therapie in Vorhersagealgorithmen übersetzt wurden.

## 1.4 Resistenzmechanismen

Um neue antiretrovirale Medikamente zu konzipieren muss die Wirkungsweise vorhandener Resistenzmutationen verstanden werden. Dabei kann ein Virus durch Mutation unterschiedliche Wege entwickeln, um gegen ein einzelnes Medikament oder sogar eine ganze Medikamentenklasse resistent zu werden. Erschwerend wirkt sich hierbei aus, dass bestimmte Medikamente noch lange Zeit im Körper persistieren können. Der Beitrag einiger bestimmter Mutationen auf die Resistenzentwicklung ist teilweise noch nicht vollständig aufgeklärt und wird weiterhin untersucht.

### 1.4.1 Resistenz gegen NRTI

Bei den biochemischen Mechanismen, durch die eine Resistenz gegenüber NRTI verursacht wird, unterscheidet man zwischen sterischer Inhibition und verstärkter Phosphorylyse. Bei sterischer Inhibition bilden sich Mutationen, die es der Reversen Transkriptase ermöglichen, aufgrund von sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor

(NRTI) und dem natürlichen Substrat (Desoxynukleosidtriphosphate, dNTP) zu unterscheiden und die NRTI nicht mehr zur Polymerisation einzusetzen. Diese Resistenzen werden z.B. durch die Mutation M184V, Q151M, L74V und K65R auf der Reversen Transkriptase vermittelt (Clavel und Hance 2004). Bei der Resistenzbildung durch Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Phosphorylyse dagegen wird die Bindung des Medikaments nicht verhindert. Vielmehr wird die Rate der phosphorylytischen Abspaltung des zum Kettenabbruch führenden Nukleosidanalogons durch ATP erhöht (Arion *et al.* 1998). Hierfür häufen sich Mutationen an der dNTP-Bindungstasche an, die eine neue ATP-Bindungsstelle definieren. Dies führt zu einer Erhöhung der Affinität der Reversen Transkriptase für ATP, wodurch die Reaktion auch unter physiologischen ATP-Konzentrationen stattfindet (Yahi *et al.* 2005). Dieser Mechanismus trifft für die Resistenzmutationen gegen Thymidin-Analoga zu.

### 1.4.2 Resistenz gegen NNRTI

Resistenzen gegenüber NNRTI entstehen durch Mutationen, welche die dreidimensionale Struktur der Bindungsstelle für den Inhibitor verändern und dadurch die Affinität der Reversen Transkriptase für den Inhibitor reduzieren. Als Folge kann das Enzym seine normale Polymerisationsgeschwindigkeit wieder aufnehmen (Esnouf *et al*. 1995). NNRTI-Resistenzmutationen können zum Wirkverlust der gesamten Medikamentenklasse führen (Kreuzresistenz). und bereits eine Mutation genügt.

### 1.4.3 Resistenz gegen Integrase-Inhibitoren

Bisher sind die Mechanismen der Resistenz gegen Integrase-Inhibitoren (INI) nicht genau bekannt. Allerdings sind die meisten resistenz-assoziierten Mutationen in der zentralen Subdomäne nahe den katalytisch aktiven Strukturen gefunden worden (siehe Abb.9, Tab.1). Bisher sind drei Mutationen  als primäre Resistenzmutationen gegen INI charakterisiert, die einen starken Wirkverlust von Raltegravir (und auch Elvitegravir) verursachen (Johnson *et al*. 2009 = IAS Liste). Die Mutationen N155H und Q148HRK sind mit einem 10- bis 25-fachen Wirkverlust beschrieben (Bartmeyer und Kücherer 2010). Die dritte als primäre Resistenzmutation bewertete Substitution findet sich an der Position 143 (IAS-Paper 2009, Tab.1). Zusätzlich gibt es sekundäre resistenz-assoziierten Mutationen, von denen vermutet wird, dass sie am Resistenzgeschehen beteiligt sind, deren Rolle noch nicht umfassend geklärt ist. So wurde z.B. der sekundären

Mutation G140S in Kombination mit Q148H ein über 100-facher Wirkverlust nachgewiesen (Hazuda *et al*. 2007). Die Wirkung von Integrase-Inhibitoren und die Rolle der sekundären Resistenzmutationen wird weiterhin erforscht.

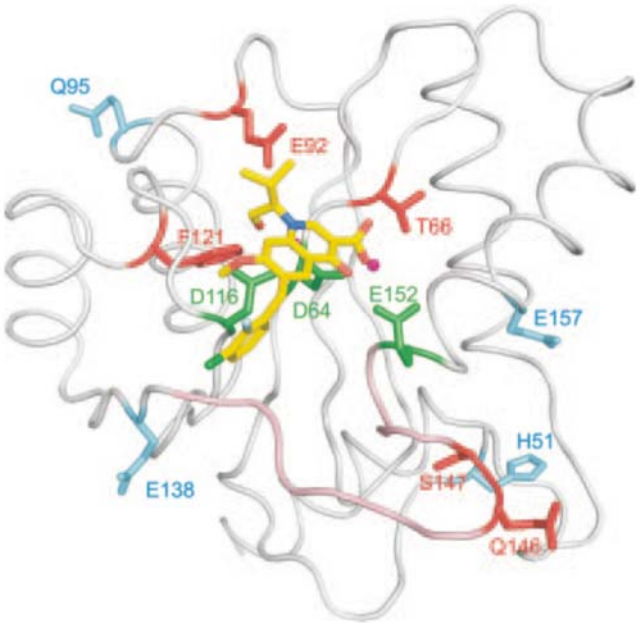


**Abb.9 Positionen von Integrasemutationen assoziiert mit Resistenzen bei Elvitegravir-Therapie**

Elvitegravir (gelb), gebunden an die zentrale Subdomäne (D-D-E Motiv, grün) und ein Magnesiumion (violett). Abgebildet sind die Aminosäuren der primären Resistenzmutation (T66, E92, F121, Q146, und S147) in rot und der sekundären Resistenzmutationen (H51, Q95, E138, und E157) in hellblau (Shimura *et al*. 2007)

**Tab.1 Primäre und sekundäre Resistenzassoziierte Mutationen von Raltegravir**

Integrase-Inhibitor (INI) Resistenzassoziierte Mutationen

| Position | 66 | 92 | 121 | 138 | 140 | **143** | 147 | **148** | 153 | **155** | 263 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| konsensus | T | E | F | E | G | **Y** | S | **Q** | S | **N** | R |
| Raltegravir* | | **Q** | **Y** | AK | **AS** | **RCH** | G | **HRK** | | **H** | |

Fett gedruckt:. Die Hauptresistenzpositionen nach der aktualisierten IAS-Mutationsliste (Johnson *et al*. 2009)

Rot markierte Mutationen sind mit einer >5 bis 10 fach verminderten Wirksamkeit des Wirkstoffes assoziiert (HIV Drug resistance database, Stanford University)

* weitere Mutationen *in vitro* oder *in vivo* durch Raltegravir L74M, T97A, V151I, E157Q, G163R, I203M und S230R/N.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Seit Beginn der Therapie von HIV-Infektionen mit antiretroviralen Medikamenten im Jahre 1987 wurde vermehrt das Auftreten von therapie-resistenten HIV beobachtet. Resistenzentwicklung limitiert den Erfolg der HAART und führt zu Therapieversagen. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind NRTI, NNRTI und PI, so dass bisher auch hauptsächlich resistenz-assoziierte Mutationen in der Protease und Reversen Transkriptase bei Therapieversagen beobachtet wurden. Das erst kürzlich zugelassene Medikament Raltegravir aus der Gruppe der Integrase-Inhibitoren gewinnt rasch an Bedeutung, da es eine sehr hohe Potenz aufweist: es hat die Eigenschaft, in sehr kurzer Zeit die Viruslast drastisch zu reduzieren. Mit häufigerem Einsatz steigt jedoch auch die Gefahr der Entwicklung von Resistenzen und somit auch das Risiko von Therapieversagen bei der Anwendung von Integrase-Inhibitoren.

In dieser Arbeit sollte eine HIV-1-spezifische *int* RT-PCR zur genotypischen Resistenzbestimmung von HIV gegenüber Integrase-Inhibitoren etabliert und validiert werden. Anhand eines HIV-Subtypreferenzpanels sollte überprüft werden, ob die *int* PCR subtyp-generisch ist.

Die Validierung der PCR sollte an Patientenproben erfolgen. Dafür wurde ein Probenpanel von therapie-naiven Patienten der HIV-1 Serokonverterstudie zusammengestellt. Patienten verschiedener Risikogruppen wurden für das Panel ausgewählt. Die Untersuchung therapie-naiver Patienten soll zudem einen Beitrag leisten, die natürliche Varianz der Integrase besser zu erfassen, um nicht resistenz–assoziierte Polymorphismen besser von resistenz-assoziierten sekundären Mutationen unterscheiden zu können.

Abschließend wurde ein Probenpanel aus einem internationalen Integrase-Ringversuch untersucht, an dem das RKI-Labor zur Qualitätssicherung teilnimmt.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

**Proben**

| | |
|---|---|
| HIV-1 NL4.3 | HIV-1 Laborstamm aus dem Plasmid pNL4.3 (Acc. No. AF 324493) durch Transfektion in 293-T-Zellen hergestellt, diente als Referenzvirus und Konzentrationsstandard (Subtyp B) |
| Subtypenpanel | 16 Isolate der HIV-1 Subtypen A-H aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe P11, (Tab.2) |
| Patientenproben | 43 Patientenproben aus der HIV-1 Serokonverterstudie P11(Poggensee *et al*. 2007), Tab.3 |
| Referenzsequenzen | 141 *int* Referenzsequenzen aus der Datenbank Los Alamos National Laboratory www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html (Tab.20, Appendix) |

**Chemikalien**

| | |
|---|---|
| Agarose | Peqlab, Erlangen |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| 6x Loading Buffer | Fermentas, St. Leon-Rot |
| GeneRulerTM 1kb | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Low Mass Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Serva, Heidelberg |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| TAE-Puffer (10x) (pH 7,9) | Tris 400mM, EDTA 10nM, Natriumacetat 500mM |

**Technische Geräte**

| | |
|---|---|
| Laborzentrifuge | Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg |
| Zykler | Tpersonal Biometra, Göttingen; GeneAmp PCRSystem 2400/9700 Perkin Elmer, Waltham-MA USA |
| Gradientenzykler | Mastercycler EPgradient Eppendorf, Hamburg |
| Videodokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 | Herolab, Wiesloch |
| Heizblock | Bio TDB-100; Biometra, Göttingen |
| Mx3005P | Stratagene , Californien USA |
| Gelelektrophorese- | Invitrogen Karlsruhe |

Kammer Horizon 58

**Enzyme**

| | |
|---|---|
| Taq-Polymerase | Invitrogen, Karlsruhe |
| Reverse Transkriptase (Superscript II) | Invitrogen, Karlsruhe |
| RNAsin | Ribonuclease Inhibitor, Promega, Madison-WI USA |
| SuperMix-UDG | Invitrogen, Karlsruhe |

**Kommerzielle Test-Kits**

| | |
|---|---|
| QIAamp Viral RNA Mini Extraction Kit | QIAGEN, Hilden |
| Invitek MSB Spin PCR apace | Invitek, Berlin |
| QIAGEN OneStep RT-PCR Kit | QIAGEN, Hilden |
| BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, Weiterstadt |

**Software**

| | |
|---|---|
| BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9.c | Tom Hall |
| Clone Manager 9, Professional Edition | Small Work Group License |
| CorelDraw Graphics Suite 12 | Corel Corporation |
| Lasergene SeqMan Pro, Version 8.0.2 | DNASTAR |
| MXPro – Mx3005P Version 4.01 | Stratagene |
| PHYLIP, Phylogeny Inference Package Version 3.6 | Joseph Felsenstein, University of Washington |
| Easy Win32-System | Herolab GmbH, Wiesloch |
| EpiCalc 2000 | Joe Gilman & Mark Myatt 1998 |

### 2.1.1 HIV-1 Subtyp Referenzpanel (Virusisolate)

Das Subtypreferenzpanel bestand aus 16 unterschiedlicher Subtypen Virusisolaten aus der Virusstocksammlung der Arbeitsgruppe (Tab.2). Die Virusstocks waren bei -70°C gelagert. Das Panel enthielt alle Subtypen mit Ausnahme von J und K sowie die rekombinanten Linien CRF01_ AE und CRF02_AG.

**Tab.2 Subtypenpanel zur Validierung der subtyp-generischen *int* PCR**

| Subtyp | Lab.Nr. | Isolate von | Isolat-bezeichnung |
|---|---|---|---|
| **A** | **2** | WHO | 92UG029 |
| **A** | **6** | WHO | 92RW009 |
| **AE** | **3** | WHO | 92TH022 |
| **AE** | **26** | WHO_Charité/PEI | 92TH009 |
| **AG** | **33** | Nigeria/RKI-Isolat | 00-0200 |
| **B** | **4** | WHO | 92TH026 |
| **B** | **22** | MvP | 6960/95 |
| **C** | **7** | WHO | 92BR025 |
| **C** | **15** | MvP | 484/97 |
| **D** | **1** | WHO | 92UG021 |
| **D** | **30** | WHO_Charité/PEI | 92UG035 |
| **F** | **9** | WHO | 93BR020 |
| **F** | **10** | WHO | 93BR029 |
| **G** | **12** | MvP | 82006/96 |
| **G** | **27** | WHO_Charité/PEI | ARP/173 RU570 |
| **H** | **28** | WHO_Charité/PEI | HIV V1557 |

### 2.1.2 Patientenpanel

Es wurde ein Panel aus Plasmaproben von 43 Patienten verschiedener Risikogruppen und Infektionsjahre zusammengestellt. Darunter waren 37 mit HIV-1 Subtyp B infiziert und je 3 mit den zirkulierenden rekombinanten Formen AE und AG (Tab.3). Der Subtyp war bisher anhand der *pol*-Sequenz bestimmt worden. Plasmaaliquots waren bei -70°C gelagert.

**Tab.3 Patientenpanel aus der HIV-1 Serokonverterstudie**

| Risikogruppe | Infektionsjahr | Subtyp | sCount |
|---|---|---|---|
| Hetero | 2000 | B | 01-00269 |
| Hetero | 2002 | B | 02-00086 |
| IVDA | 2002 | B | 02-00641 |
| MSM | 2002 | B | 02-00695 |
| MSM | 2000 | B | 03-00049 |
| MSM | 2003 | B | 03-00053 |
| MSM | 2000 | B | 03-00140 |
| MSM | 2003 | B | 03-00148 |
| MSM | 2003 | B | 03-00193 |
| MSM | 2003 | B | 03-00233 |
| MSM | 2003 | B | 03-00248 |
| IVDA | 2003 | B | 03-00336 |
| Hetero | 2004 | B | 04-00018 |
| MSM | 2004 | B | 04-00255 |
| MSM | 2004 | B | 04-00290 |
| IVDA | 2004 | B | 04-00384 |
| MSM | 2004 | B | 04-00496 |
| HPL | 2004 | CRF02_AG | 04-00497 |
| MSM | 2004 | B | 04-00518 |
| IVDA | 2004 | B | 04-00540 |
| Hetero | 2004 | B | 04-00542 |
| IVDA | 2004 | B | 04-00653 |
| MSM | 2004 | B | 04-00670 |
| Hetero | 2005 | B | 05-00084 |
| IVDA | 2005 | B | 05-00104 |
| Hetero | 2004 | B | 05-00123 |
| Hetero | 2005 | B | 05-00310 |
| Hetero | 2005 | B | 05-00339 |
| MSM | 2005 | B | 05-00492 |
| Hetero | 2005 | B | 05-00513 |
| MSM | 2005 | B | 05-00516 |
| MSM | 2005 | B | 05-00638 |
| MSM | 2005 | B | 05-00764 |
| IVDA | 2005 | B | 05-00938 |
| HPL | 2005 | CRF01_AE | 05-01160 |
| IVDA | 2005 | B | 05-01173 |
| HPL | 2005 | CRF02_AG | 06-00006 |
| HPL | 2006 | CRF01_AE | 06-00368 |
| HPL | 2006 | CRF01_AE | 06-00524 |
| Hetero | 2006 | B | 06-00536 |
| Hetero | 2006 | B | 06-00672 |
| Hetero | 2006 | B | 06-00793 |
| HPL | 2006 | CRF02_AG | 07-00138 |

### 2.1.3 Externe Qualitätskontrolle

Vom *Dept. of Virology* des *University Medical Center* in Utrecht, Niederlande wurde ein erster internationaler Integrase-Ringversuch (externe Qualitätskontrolle) initiiert. Das Probenpanel beinhaltete 23 Proben zur Untersuchung auf Amplifizierbarkeit und Nachweisgrenze. Von sieben Proben sollte zudem die Sequenz ermittelt werden.

**Tab.4 Probenpanel des Ringversuches**

| Lab.Nr. | Isolat-bezeichnung | Sequenzierung |
|---|---|---|
| **09-4065** | Int-01_9009 | **ja** |
| **09-4066** | Int-02_9009 | |
| **09-4067** | Int-03_9009 | |
| **09-4068** | Int-04_9009 | |
| **09-4069** | Int-05_9009 | |
| **09-4070** | Int-06_9009 | |
| **09-4071** | Int-07_9009 | **ja** |
| **09-4072** | Int-08_9009 | |
| **09-4073** | Int-10_9009 | |
| **09-4074** | Int-11_9009 | |
| **09-4075** | Int-12_9009 | **ja** |
| **09-4076** | Int-13_9009 | |
| **09-4077** | Int-14_9009 | **ja** |
| **09-4078** | Int-15_9009 | **ja** |
| **09-4079** | Int-16_9009 | |
| **09-4080** | Int-17_9009 | |
| **09-4081** | Int-19_9009 | |
| **09-4082** | Int-20_9009 | **ja** |
| **09-4083** | Int-21_9009 | |
| **09-4084** | Int-22_9009 | |
| **09-4085** | Int-23_9009 | **ja** |
| **09-4086** | Int-24_9009 | |
| **09-4087** | Int-25_9009 | |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung des Konzentrationsstandards

Als Konzentrationsstandard für die Bestimmung der Nachweisgrenze der *int* RT-PCR (Sensitivität) und Viruslastbestimmungen wurde aus dem NL4.3 Virusstock eine serielle Verdünnungsreihe in 10er Schritten in negativem humanen Plasma (10 ml pro Verdünnungsschritt) hergestellt. Diese Verdünnungsreihe umfasste Verdünnungen mit einer Viruslast von $6{,}5 \times 10^8$ geq (Genomäquivalente)/ml bis zu 6,5 geq/ml, die bei -70°C aliquotiert gelagert wurden. Für die exaktere Bestimmung der Nachweisgrenze der

*int*-PCR wurden auch serielle 1:3 Verdünnungen nahe des Endpunktes hergestellt. Die Konzentration des Virusstocks NL4.3 war von einem externen Labor im Abbott Realtime Test zur Viruslastbestimmung in mehreren Verdünnungen ermittelt worden. Bei Bedarf wurde die Viruslast in den hergestellten Verdünnungen in einer inhouse LTR-TaqMan PCR überprüft.

### 2.2.2 RNA-Extraktion

Alle RNAs wurden mit dem QIAmp Mini Extraction Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. 500 µl Plasma wurden auf Eis aufgetaut und zur Entfernung von Kryopräzipitaten mit 2.600 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. 450 µl Überstand wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zur Virusanreicherung mit 20.000 g für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme von 310 µl Überstand wurde aus den verbleibenden 140 µl entsprechend dem Protokoll des viralen RNA-Kits (QIAGEN) weiterverfahren. Das Kitsystem nutzt dafür ein Säulenverfahren (Spin column) zur Aufreinigung. Die RNA wurde in 60 µl Puffer eluiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C für maximal sechs Monate.

### 2.2.3 *int* RT-PCR

***cDNA Synthese***

Die RNA muss vor der PCR erst in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Dazu nutzt man die Reverse Transkriptase, die virale RNA in cDNA umschreibt. Zur Synthese benötigt die Reverse Transkriptase einen anti-sense Primer, der sequenzspezifisch an die RNA hybridisiert und von dessen 3'-OH-Ende die Reverse Transkription startet (Abb.4).

***Polymerase-Kettenreaktion***

Aus der cDNA wird mittels einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase sowie sequenz-spezifischer sense und anti-sense Primer in einer PCR doppelsträngige DNA definierter Größe erzeugt. Dabei unterscheidet man drei Phasen: die Denaturierung, die Primerhybridisierung (*annealing*) und die Elongation. Die verwendete Temperatur für die Primerhybridisierung hängt vor allem von der Länge sowie dem Gehalt an Guanin und Cytosin der verwendeten Primer ab. Die hybridisierten Primer liefern durch

ihre freie 3´-Hydoxylgruppe den Startpunkt für die 5´→3´-DNA-Synthese, wobei die DNA-Polymerase die Anlagerung von 2´-Desoxy-Nukleosid5´Triphosphaten komplementär zur Basensequenz der Matrize bei 72°C katalysiert.

***int RT-PCR mit dem Qiagen One Step RT-PCR Kit***

Für die *int*-RT-PCR wurde das One Step RT-PCR Kit System von QIAGEN verwendet. Das System verbindet die Schritte einer RT-PCR in einem Reaktionsansatz. Denaturierung der RNA, cDNA-Synthese sowie die Amplifikation werden nicht in drei einzelnen Reaktionen durchgeführt. Die PCR-Primersequenzen sowie das Thermozyklerprogramm wurden einem Kölner Kooperationspartner (Dr. Rolf Kaiser, Virologisches Institut der Universität Köln) übernommen (Sichtig *et al*. 2009).

**Tab.5 Sequenz der Viruslast- und Integraseprimer**

| **Primer** | | Koordinaten HXB2 |
|---|---|---|
| Viruslast | | |
| LTR_524_s | 5'- CTC AAT AAA GCT TGC CTT G -3' | 524 – 542 |
| LTR_625_as | 5'- GCG CCA CTG CTA GAG AT -3' | 625 – 641 |
| TM-LTR_2 | 5'- Fam -TCT GAG GGA TCT CTA GYT ACC AGA GT-BHQ-1 -3' | 578 – 603 |
| Integrase* | | |
| 5´-INT | 5'- ATT GGA GGA AAT GAA CAA GT -3' | 4173 – 4192 |
| 3p31 | 5'- ATC CTG TCT ACY TGC CAC ACA A -3' | 5065 – 5089 |
| F2s | 5'- TAA GAC AGG AGT ACA AAT GGC AG -3' | 4745 – 4767 |
| F3as | *5'- GCT GCT CCT GTA ATA AAC CCG -3'* | 4899 – 4919 |

* PCR-Primer (5-´INT und 3p31) Sequenzierprimer (5-´INT, 3p31, F2s, F3as )
HXB2 Acc.No.: K03455

***Reverse Transkription***

Die Reverse Transkription erfolgte im ersten Zyklus der OneStep RT-PCR bei 50°C für 30 Minuten. Der darauffolgende 95°C Schritt diente der Deaktivierung der RT sowie der Aktivierung der „*hotstart*“ DNA-Polymerase. In der direkt anschließenden PCR wurde die cDNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert (*denaturation*). Das darauffolgende Abkühlen auf die Annealingtemperatur von 65°C ermöglichte die Hybridisierung der beiden sequenz-spezifischen PCR-Primer. Es sind zwei „*touch-down*“ Zyklen eingebaut: die anfänglich höhere Temperatur von 65°C im ersten und 60°C im zweiten Zyklus führt zu einer Hybridisierung an die cDNA. Von Zyklus 3 bis 47 wurde eine Annealingtemperatur von 55°C für das Primerpaar gewählt. Es wird ein PCR-Fragment von 916

bp amplifiziert (Abb.4). Es wurde stets eine NL4.3 Positivkontrolle ($6{,}5x10^6$ geq/ml) sowie eine Negativkontrolle (humanes Plasma) mitgeführt.

Die PCR-Produkte wurden bis zur Aufreinigung kurzfristig bei 4°C gelagert, kam es zu einer Verlängerung der Lagerzeit wurden die Proben auf -20°C umgelagert.

**Tab.6 Zykler Programm One Step RT-PCR**

| Zykler Programm: One Step | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---|---|---|---|
| | 50°C | 30 min | 1x |
| | 95°C | 15 min | |
| | 95°C | 30 sec | 2x |
| | 65°C *touch-down* -5K | 45 sec | |
| | 72°C | 3 min | |
| | 95°C | 30 sec | 45x |
| | 55°C | 45 sec | |
| | 72°C | 3 min | |
| | 72°C | 10 min | 1x |
| | 4°C | | |
| Lagerung | 4°C | | |

### 2.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuremoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in der Gelmatrix im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle bewegen sich dabei in Richtung der Anode. Hierbei wandern kleinere Moleküle schneller als größere durch die Gelmatrix (Agarose). Die Trenneigenschaft der Agarose wird anhand der Konzentration eingestellt. Nach der Auftrennung können die Nukleinsäuren nach Interkalation von Ethidiumbromid, das im interkalierten Zustand durch Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 260 nm fluoresziert, sichtbar gemacht werden. Der Logarithmus des Molekulargewichtes ist proportional zur Wanderungstrecke der DNA-Fragmente im Gel. Zur Größenbestimmung der DNA-Moleküle wird ein geeigneter Größenstandard mitgeführt und die PCR-Produktgröße anhand der Eichkurve, die aus dem Größenstandard berechnet wird, ermittelt. Dazu wurde eine 1kB Leiter von Fermentas genutzt. Die Menge eines DNA-Fragmentes wird analog anhand eines Konzentrationsstandards bestimmt (hier: Low Mass Ladder, Fermentas)

Die DNA-Proben (PCR-Ansatz oder gereinigtes PCR-Produkt) wurden zur Untersuchung mit Ladepuffer versetzt. Es wurden 1,5 % Agarose-Gele (Peqlab, Erlangen) und als Elektrophoresepuffer 1x TAE-Puffer verwendet, wobei sowohl Gel als auch Puffer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Kammern bei 90 V durchgeführt. Zur Auswertung (Größen- und Mengenbestimmung) kam das Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 (Herolab, Wiesloch) zum Einsatz. Die *int* PCR wurde als positiv gewertet, wenn ein PCR-Produkt der richtigen Größe erhalten wurde und alle Testkontrollen (Neg/Pos) das erwartete Ergebnis erbrachten.

### 2.2.5 Aufreinigung von DNA

Um die amplifizierten *int*-Fragmente von Primern, Nukleotiden, Enzymen und Salzen zu trennen, erfolgte die Aufreinigung mittels Invitek MSB Spin PCR apace (Invitek, Berlin). In diesem System wird die DNA in einem Hochsalz-Puffer selektiv an eine Silica-Membran (Spin Column) gebunden, durch Waschschritte gereinigt und schließlich mit einem Puffer ohne Salz eluiert. Die Elution der PCR-Produkte erfolgte in einem Volumen von 50 µl. Das aufgereinigte Produkt (3µl) konnte nach der Bestimmung des DNA Gehaltes (Gelelektrophorese mit 300ng Konzentrationsstandard) für die Sequenzierung verwendet werden.

### 2.2.6 TaqMan Real-time RT-PCR

Zur Bestimmung der Viruslast von Patientenproben und Zellkulturüberständen wurde eine spezifische Real-time RT-PCR genutzt, bei der ein LTR-Abschnitt Gruppengenerisch nach einem etablierten *inhouse*-Protokoll amplifiziert wurde (Selige 2002). Bei dieser RT-PCR wurden die cDNA-Synthese und die PCR in zwei getrennten Schritten durchgeführt. Es wurde ein 150 bp großes LTR-Fragment ampflifiziert. Dazu wurden eine FAM-BHQ-Sonde und zwei Primer verwendet (Tab.5). Die Durchführung der Real-time RT-PCR erfolgte in einem Stratagene MXpro-3004 und konnte anhand des in Doppelbestimmung mitgeführten Konzentrationsstandards (2.2.1) mit der Gerätesoftware quantitativ ausgewertet werden. Alle Proben wurden dreifach bestimmt. Bei der Auswertung wurde beachtet, dass erst ab der Überschreitung eines Schwellenwertes (*threshold*) ein Signal als positiv gewertet werden kann. Die quantitative Nachweisgrenze lag bei 100 geq/ml.

***Messprinzip***

In der Real-time RT-PCR wird die 5´→3´Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt. Nach Denaturierung der DNA werden die sequenzspezifischen Primer sowie die Sonde hybridisiert. Die Sonde ist ein sequenzspezifisches antisense Oligonukleotid, das am 3´-Ende einen Quencher *(BHQ = Black Hole Quencher)* besitzt und am 5´-Ende mit einem Fluorophor *(FAM)* markiert ist. Befinden sich der Quencher und das Fluorophor in räumlicher Nähe, so wird ein Fluoreszenzsignal durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Die Taq-Polymerase baut nun während der Elongation mithilfe ihrer 5´→3´Exonuklease-Aktivität den Quencher sowie das Fluorophor an der Sonde ab. Das Fluoreszenzsignal kann nun nicht mehr vom Quencher unterdrückt werden, und es kommt während der PCR zur exponentiellen Zunahme des Fluoreszenzsignals. Am Ende jedes Elongationszxklus erfolgt eine Fluoreszensmessung.

**Tab.7 Zykler Programm LTR-RT-PCR**

Zykler Programm:

| *LTR* RT-PCR | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---|---|---|---|
| | 50°C | 2 min | 1x |
| | 94°C | 10 sec | |
| | 94°C | 15 sec | 45x |
| Messpunkt | 53°C | 30 sec | |
| | Raumtemperatur | | 1x |

## 2.2.7 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurde das Kettenabbruchverfahren nach Sanger verwendet (Sanger *et al*. 1977). Die DNA-Synthese erfolgt prozessiv bis zum Einbau eines ddNTP (Didesoxyribonukleosid-Triphosphat**).** Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tab.5 angegeben. Die ddNTP sind basen-spezifisch fluoreszensmarkiert und befinden sich nach Einbau am 3‘-Ende des terminierten PCR-Produktes. Die Sequenzreaktion erfolgte nach einem *cyclesequencing* Protokoll, wodurch wenig Ausgangstemplate benötigt wird. Es wurde nach einem Standardprotokoll mit dem BigDye Terminator v 3.1 Mix von (ABI) sequenziert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert und vom hauseigenen Sequenzierungsservice durch Gelfiltration aufgereinigt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzprodukte in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (Kapillarsequencer 3130xL Genetic Analyzer, ABI) wurden

die markierten DNA-Fragmente durch Laserstrahlung zur Fluoreszenz angeregt. Aus diesen Signalen wurde die Basenabfolge ermittelt (Sequene Analysis Programm, ABI) und pro Primer eine Sequenzdatei erhalten. Die erhaltenen Elektropherogramme mit zugeordneter Basenabfolge wurden anschließend zu einer Konsensussequenz ausgewertet.

**Tab.8 Zykler Programm Sequenzierung**

Zykler Programm:

| INT-Sequenz | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---|---|---|---|
| | 96°C | 2 min | 1x |
| | 96°C | 10 sec | 25x |
| | 55°C | 5 sec | |
| | 60°C | 4 min | |
| | 4° C | | 1x |
| Lagerung | -20°C | | |

### 2.2.8 Sequenzauswertung

Aus den vier Einzelsequenzen wurde mit den Programm SeqMan ein Contig der Integrase erzeugt. (englisch *contiguos* = zusammenhängend). Dabei wird zeitgleich eine Konsensussequenz erstellt. Da HIV als Quasispezies vorliegt können Variantenmischungen vorliegen, die bei der Sequenzierung mit fluoreszenz-markierten Terminatoren ab 20-25% Anteil in der Viruspopulation detektiert werden. Liegt eine solche Variantenmischung vor, resultiert dies in Sequenzmolekülen gleicher Länge, die jedoch mit verschiedenen Basen terminiert sind, daher kommt es zur Überlagerung von Fluoreszenzsignalen (Abb.10). Die Varianten werden entsprechend des IUB Codes mit definierten Buchstaben benannt (Tab.9) Für die Akzeptanz von Variantenmischungen wurde beim Auswerten beachtet, dass die zusätzlichen Peaks in mindestens zwei verschiedenen Sequenzen vorkommen und an dieser Stelle in den Einzelsequenzen kein Hintergrundrauschen zu beobachten war. Bei der Translation der Nukleotidsequenz entsprechend des degenerierten Codes (Tab.10) kann bei Vorliegen von IUB-Positionen keine Aminosäure translatiert werden. SeqMan setzt an dieser Position ein X ein.

### 2.2.9 Subtypbestimmung

Zur Subtypbestimmung der Integrase-Sequenz wurde ein Sequenzalignment mithilfe von ClustalW und Referenzsequenzen erstellt, daraus eine Distanzmatrix mit Kimura 2 Parameter Modell berechnet und ein Stammbaum mit dem *Neighborjoining*-Verfahren ermittelt. Die Topologie des berechneten *Neighborjoining*-Stammbaumes wurde mit Treeview dargestellt. Diese Programme sind im BioEdit implementiert und wurden dort benutzt. Zur Bewertung der Signifikanz der Knoten (Verzweigungspunkte) im Stammbaum wurde eine Bootstrap Analyse mit PHYLIP und 1000 Replikaten durchgeführt. Knoten, die in >70% der Analysen auftraten, wurden als signifikant erachtet. Sequenzen desselben Subtyps liegen in einer monophyletischen Gruppe (*clade*) zusammen. Der innere Knoten, von dem sie abzweigen, entspricht dem hypothetischen gemeinsamen Vorfahren. Durch *Neighborjoining*-Stammbaumanalyse wurde ebenfalls überprüft, ob identische oder eng verwandte Sequenzen, die aus einem PCR-Lauf stammten, Hinweise auf eine Kreuzkontamination lieferten. Bei Vorliegen einer Infektkette traten ebenfalls eng verwandte Sequenzen auf. Die Unterscheidung zwischen Infektkette und Kreuzkontamination gelingt nur mithilfe der Untersuchung von Verlaufsproben desselben Patienten.

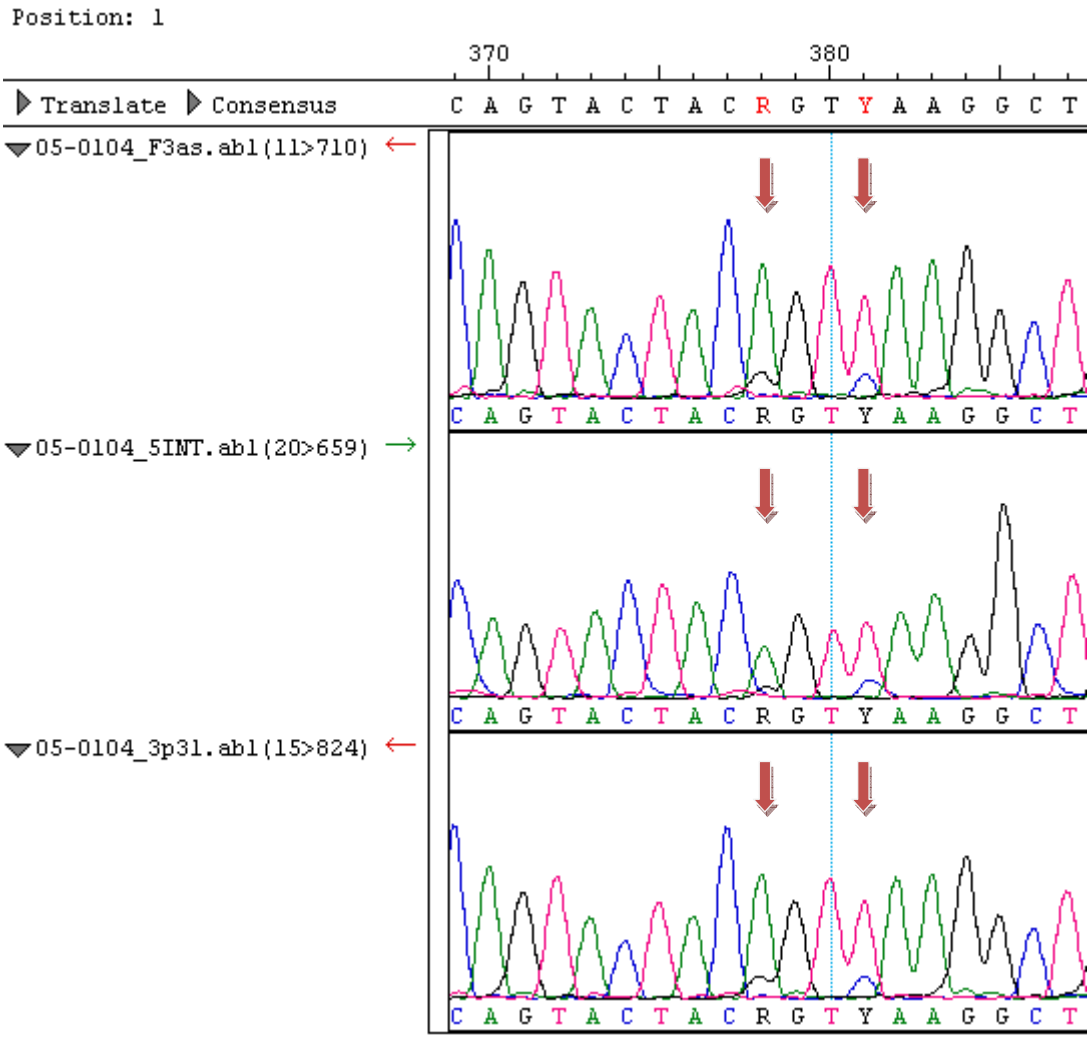


**Abb.10 Beispiele Elektropherogramm**

Drei Primersequenzen in *sense* und *antisense* Richtung, rote Pfeile: Signalüberlagerung

**Tab.9 Code der *International Union of Biochemistry* für Basen und Basenmischungen**

| IUB | Bedeutung |
|---|---|
| A | Adenosine |
| C | Cytidine |
| G | Guanine |
| T | Thymidine |
| U | Uridine |
| M | **A oder C** |
| R | **A oder G** |
| W | **A oder T** |
| S | **G oder C** |
| Y | **C oder T** |
| K | **G oder T** |
| V | **A G oder C** |
| H | **A C oder T** |
| D | **A G oder T** |
| B | **A T oder C** |

| | |
|---|---|
| N | A G C oder T |

**Tab.10 Buchstabencode der Aminosäuren und Translation nach dem degenerierten Code**

| 3-Buchstabencode | | Bedeutung | Codons | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Ala | Alanin | GCT | GCC | GCA | GCG | | |
| B | Asp, Asn | Asparagin/Aspertat | GAT | GAC | AAT | AAC | | |
| C | Cys | Cystein | TGT | TGC | | | | |
| D | Asp | Aspartat | GAT | GAC | | | | |
| E | Glu | Glutamat | GAA | GAG | | | | |
| F | Phe | Phenylalanin | TTT | TTC | | | | |
| G | Gly | Glycin | GGT | GGC | GGA | GGG | | |
| H | His | Histidin | CAT | CAC | | | | |
| I | Ile | Isoleucin | ATT | ATC | ATA | | | |
| K | Lys | Lysin | AAA | AAG | | | | |
| L | Leu | Leucin | TTG | TTA | CTT | CTC | CTA | CTG |
| M | Met | Methionin | ATG | | | | | |
| N | Asn | Asparagin | AAT | AAC | | | | |
| P | Pro | Prolin | CCT | CCC | CCA | CCG | | |
| Q | Gln | Glutamin | CAA | CAG | | | | |
| R | Arg | Arginin | CGT | CGC | CGA | CGG | AGA | AGG |
| S | Ser | Serin | TCT | TCC | TCA | TCG | AGT | AGC |
| T | Thr | Threonin | ACT | ACC | ACA | ACG | | |
| V | Val | Valin | GTT | GTC | GTA | GTG | | |
| W | Trp | Tryptophan | TGG | | | | | |
| X | XXX | unbekannt | NNN | | | | | |
| Y | Tyr | Tyrosin | TAT | TAC | | | | |
| Z | Glu/Gln | Glutamin/Glutamat | GAA | GAG | CAA | CAG | | |
| * | End | Stop codon | TAA | TAG | TGA | | | |

### 2.2.10 Sequenzbewertung

Von der Konsensussequenz des Contigs wurden die Primersequenzen von den Enden der Sequenzdaten und aus SeqMan im Fasta-Format exportiert. Durch Alignment und Vergleich mit einer Referenzsequenz eines sensitiven Wildtyps vom Subtyp B (HXB2, Stanford: consensus B) wurden Aminosäureaustausche identifiziert und ihre Resistenzassoziation entsprechend der IAS Liste 2009 bewertet (Johnson *et al*. 2009).

Für die Bestimmung wurde auch der Vorhersagealgorithmus der Stanford University (*HIV drug resistance database*, hivdb.stanford.edu) genutzt. Die identifizierten Mutationen wurden in einer Tabelle erfasst und ihre Häufigkeiten ermittelt.

# 3 Ergebnisse

Der neu zugelassene Integrase-Inhibitor Raltegravir wird bisher für HIV-Patienten empfohlen, bei denen zuvor eingesetzte Medikamente aufgrund von Resistenz gegenüber dem vorangegangenen Therapieregime versagten (Salvage-Therapie). Es ist davon auszugehen, dass diese gut wirksame Medikamentenklasse zunehmend zur Therapie eingesetzt wird. In den Zulassungstudien sind primäre und sekundäre Resistenzmutationen in der Integrase identifiziert worden, die einen resistenten Phänotyp verursachen. Zu Beginn dieser Bachelorarbeit gab es noch keinen kommerziellen Resistenztest zur Analyse der genotypischen Integrase-Resistenz. Von einem Kooperationspartner (R. Kaiser, Institut für Virologie, Uni Köln) wurden der Arbeitsgruppe am RKI Primersequenzen und ein RT-PCR-Protokoll zur Verfügung gestellt, um diese Resistenztestung am RKI zu etablieren. In der *int* RT-PCR wird ein 916 bp langes DNA-Fragment aus der HIV-1 *pol*-Region amplifiziert, das die Integrase von Aminosäure 1 bis 279 kodiert (Abb.4). Das heißt, 10 Aminosäuren der Integrase fehlen am 3'-Ende, aber in diesem Abschnitt des Enzyms wurden keine Resistenzmutationen identifiziert. Ausgehend von dem vorgegebenen Protokoll sollte in dieser Arbeit zunächst die Nachweisgrenze dieser *int* RT-PCR an dem Laborstamm NL4.3 (Subtyp B) ermittelt werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob verschiedene HIV-1 Subtypen und zirkulierende rekombinante Formen nachgewiesen werden können und wie die Sensitivität für die verschiedenen Subtypen ist. Bei unzureichender Sensitivität und Spezifität (Amplifikation nicht subtypgenerisch) sollte eine Optimierung des RT-PCR Protokolles vorgenommen werden.

## 3.1 Sensitivität für Subtyp B

Die Kenntnis über die Nachweisgrenze einer PCR - die Sensitivität - ist eine wichtige Kenngröße, um den Aussagewert von negativen PCR-Ergebnissen beurteilen zu können. Vom Kooperationspartner, der das Protokoll zur Verfügung gestellt hatte, lagen keine Angaben dazu vor.

Um die Nachweisgrenze für Subtyp B zu ermitteln, wurde aus einem Virusstock des molekularen Klons NL4.3 eine serielle Verdünnungsreihe von $6{,}5 \times 10^7$ geq/ml bis 6,5 geq/ml hergestellt und die RNA extrahiert. Zur statistischen Absicherung wurde die RNA aus der Verdünnungsreihe 6x unabhängig extrahiert und jede Verdünnungstufe in Doppelbestimmung untersucht. Zusätzlich wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt,

die mit kleineren Verdünnungsstufen (1:3) eine exaktere Endpunktbestimmung ermöglichten. Das Amplifikat hatte die erwartete Größe von ca. 900 bp (Abb.11). Bei höheren Kopiezahlen entstanden PCR-Produkte, die größer waren als das erwartete Fragment und keine distinkte Bande mehr darstellten, sondern als fluoreszierender "Schmier" oberhalb der Zielbande zu erkennen waren. (Abb.11 Spur 3-6). Die Negativkontrollen waren in den Versuchsreihen immer negativ. Gelegentlich wurden unspezifische Nebenbanden beobachtet.

Der Mittelwert für die Sensitivität lag bei 457 geq/ml mit einer Standardabweichung von +/- 260 geq/ml (Tab.16, Appendix).

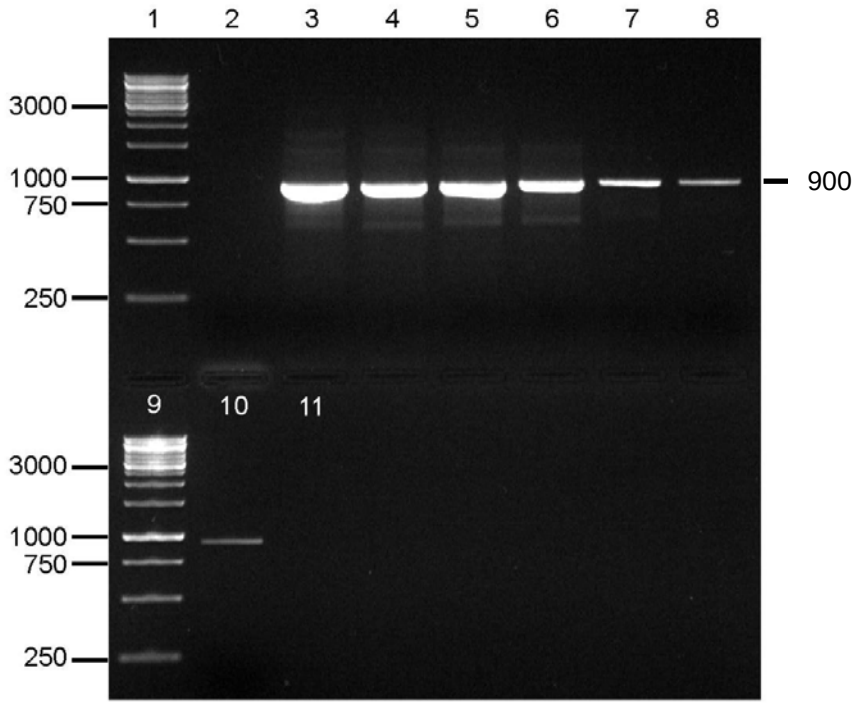


**Abb.11 Sensitivität der *int* RT-PCR mit HIV-1 NL4.3**

1,5% Agarosegel angefärbt mit EtBr; Spurbelegung: Spur 1 und 9 GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder (Invitrogen); Spur 2 Negativkontrolle; Spuren 3-8,10,11 NL4.3 1:10 Verdünnungsreihe $6{,}5 \times 10^7$ geq/ml bis 6,5 geq/ml Die Größe des *int* PCR-Produktes betrug ca. 900 bp (rechnerisch 916 bp)

## 3.2 Subtyp-generische Amplifikation der HIV-1 Subtypen

Da von HIV-1 verschiedene Subtypen und rekombinante Formen zirkulieren, sollte die *int* RT-PCR dahingehend überprüft werden, ob und wie sensitiv verschiedene Subtypen damit amplifiziert werden können. Dazu wurde von den Virusstocks des Subtypenrefe-

renzpanels mit 1-3 Isolaten pro Subtyp (Abb.12) zunächst die Viruslast mit der LTR-TaqMan-RT-PCR bestimmt und alle Virusstocks vor der Extraktion auf dieselbe Viruslast von $10^7$ geq/ml eingestellt. Nach der Extraktion wurde eine serielle 1:10 Verdünnung mit unspezifischer Träger t-RNA (*E.coli*) bis zu 1 geq/ml erstellt. Das Ergebnis der *int* RT-PCR in Doppelbestimmung wurde wiederum nach der DNA-Agarosegelelektrophorese bewertet. Aus den Doppelbestimmungen aller Isolate pro Subtyp wurde der Mittelwert der Nachweisgrenze berechnet (Abb.12). Die Sensitivität der *int* RT-PCR liegt für 7/10 Subtypen (inkl. CRF) bei Mittelwerten von 500 bis 10.000 geq/ml. Bei 2/10 Subtypen lag die Nachweisgrenze sehr hoch: Subtyp C Viren wurden mit einer mittleren Nachweisgrenze von $1{,}48x10^6$ geq/ml (+/- $2{,}0x10^6$geq/ml) am schlechtesten erfasst, gefolgt von Subtyp F mit $1{,}64x10^5$ geq/ml (+/- $2{,}3x10^5$geq/ml) (Abb. 13). Der Referenzstamm NL4.3 wurde mit einer mittleren Nachweisgrenze von 457 geq/ml (+/- 260 geq/ml) am sensitivsten detektiert, während andere Subtyp B Viren eine Nachweisgrenze von $3{,}7x10^4$ geq/ml aufweisen.

Um Schwankungen in der RNA-Konzentration durch Extraktion bzw. in RNA-Verdünnungsreihen als Ursache für die beobachteten Unterschiede auszuschließen, wurde die Viruslast der finalen RNA-Verdünnungen kontrolliert. Die gemessenen Viruslasten entsprachen weitgehend den erwarteten Viruslasten. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die *int* RT-PCR die Subtypen C und F unterschiedlich effizient amplifiziert.

Bei zwei Isolaten, einem Subtyp G- und einem Subtyp B-Isolat wurden einmalig unspezifische Nebenbanden beobachtet. In der Wiederholung tauchten diese Banden allerdings nur noch sehr schwach auf (Abb.13 und Tab.11). Die Positivkontrollen sowie die Negativkontrollen wurden in allen Versuchen von der Extraktion bis zur Auswertung mitgeführt und blieben positiv bzw. negativ.

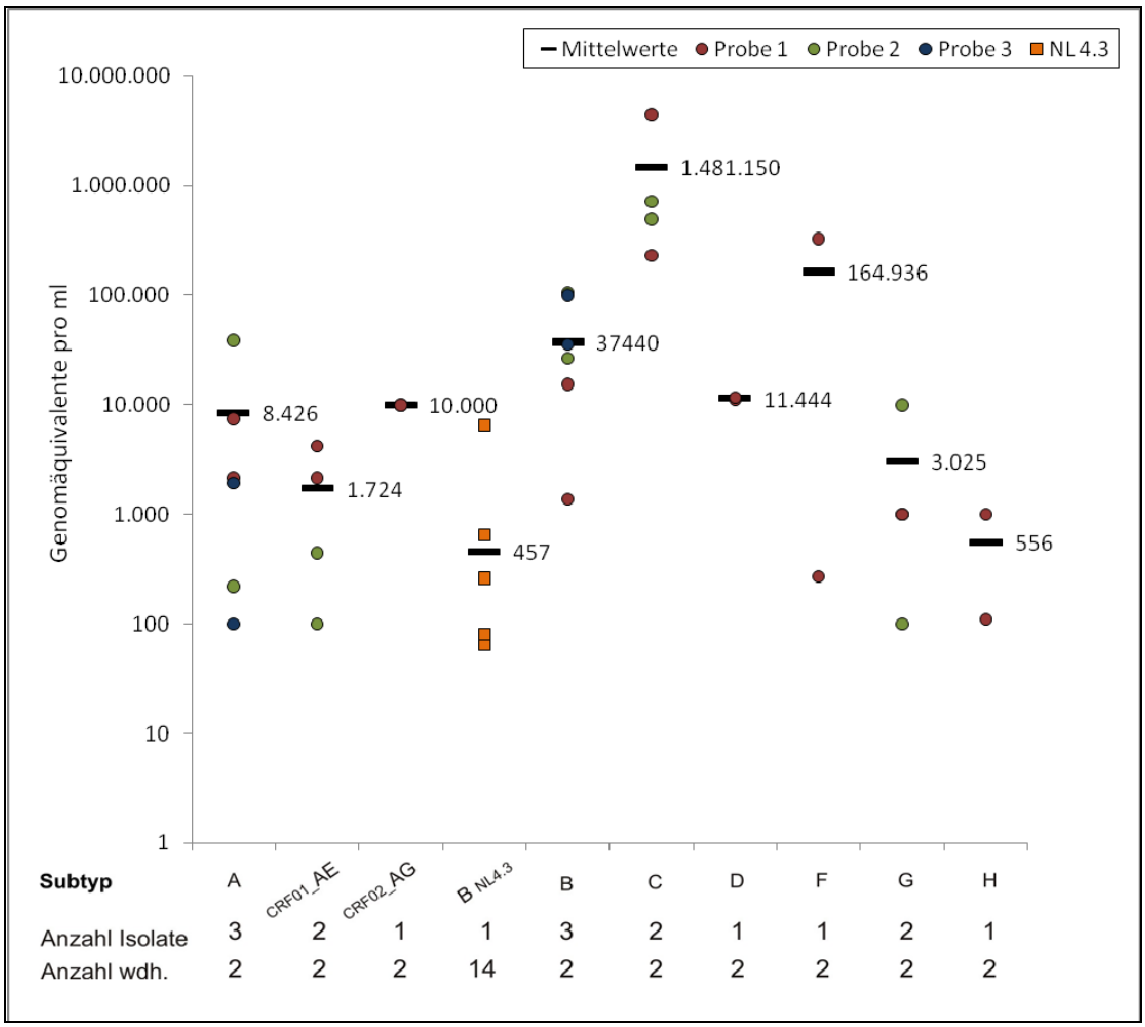


**Abb.12 Nachweisgrenze der *int* RT-PCR für HIV-1 Subtypen und CRF**

Der Balken und die Zahlen geben den berechneten Mittelwert an. Die Punkte stellen die Werte der Einzelmessung dar. Doppelbestimmungen derselben Probe sind in derselben Farbe markiert. NL4.3 wurde Mehrfachbestimmt und ist mit Kästchen markiert.

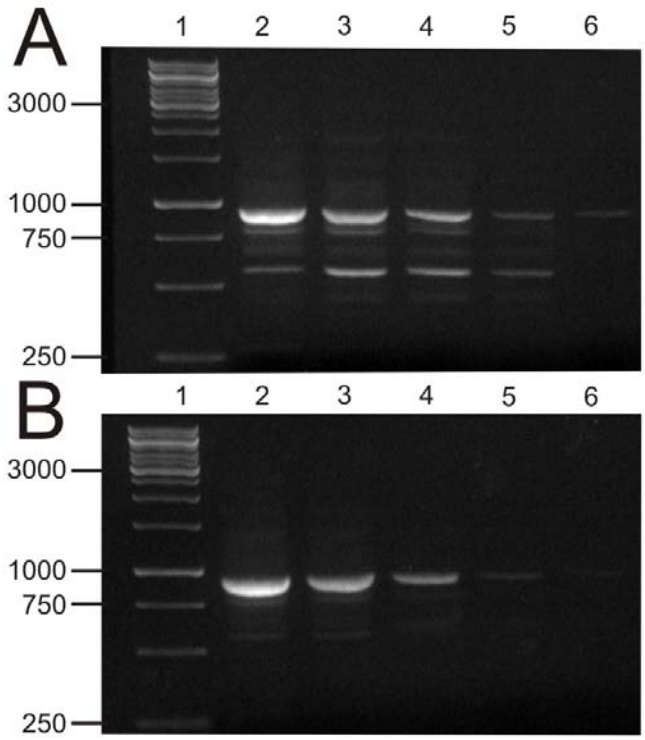


**Abb.13 Auftreten von unspezifischen Nebenbanden bei Subtyp G**
1,5% Agarosegel mit EtBr; Spurbelegung A: Spur 1: GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder (Invitrogen), Spur 2 – 6 Verdünnungsreihe Subtyp G Isolat Nr. 12 von $1x10^7$ bis $1x10^3$ geq/ml; B (Wiederholung) 1 kB DNA Ladder (Invitrogen), Spur 2 – 6 Verdünnungsreihe Subtyp G Isolat Nr. 12 von $1x10^7$ bis $1x10^3$ geq/ml,

## 3.3 Überprüfung des Subtyps der Integrase-Sequenz der Subtyp-Referenzviren

Der HIV-1 Subtyp der Subtyp-Referenzisolate war im Labor nach Vermehrung der Virusisolate, die aus dem AIDS *Research and Reference Program* bezogen wurden, an folgenden subgenomischen Regionen überprüft worden: *LTR*, *gag* p17, *pol*-Protease und RT, *env* gp120, *env* gp41. Nur von einigen Isolaten liegt eine full-length Genomsequenz in der Datenbank vor (Tab.17, Appendix). Daher sollte auch der Subtyp der Integrase-Sequenzen bestimmt werden. Die PCR-Produkte (3.2) wurden aufgereinigt und sequenziert. Die 16 Sequenzen der Referenzisolate wurden mit 141 Subtyp-Referenzsequenzen (Tab.20 Appendix) mit dem Programm CLUSTALW (in Bioedit-Software integriert) aliniert und mit PHYLIP (version 3.69) ein distanz-basierter *Neighborjoining*-Stammbaum berechnet, der mit *Treeview* grafisch dargestellt wurde. Die bekannten HIV-1 Gruppen M, N und O und ebenso die Subtypen der M-Gruppe clustern in monophyletischen Gruppen nach einem gemeinsamen Vorfahren (Knoten mit signifi-

kantem Bootstrapwert). Der Subtyp der *int*-Sequenz entspricht der monophyletischen Gruppe (engl. *Clade*), in der die Sequenz lokalisiert ist. Die Lokalisation der rekombinanten Viren, die als Referenzviren in dem Alignment enhalten waren, bildeten nicht immer eigenständige signifikante *Clades* aus, sondern waren in Subtyp-*Clades* lokalisiert, die ihrer rekombinanten Genomstruktur entsprachen. Dies trifft insbesondere für die CRF10, 18, 19, 26, 36 und 37 zu, die eine Rekombinationsstelle (*Breakpoint*) innerhalb der analysierten Integrase-Sequenz von 840 bp aufweisen.

Zwei der 16 *int*-Sequenzen aus den Referenzisolaten wiesen nicht den erwarteten Subtypen auf (Abb.14): Für die HIV-Isolate F-10 und D-30 war der ermittelte Subtyp B bzw. A1 (Tab.11). Bei der Ermittlung der Nachweisgrenze der *int* RT-PCR für die verschiedenen Subtypen wurde der hier ermittelte *int*-Subtyp zu Grunde gelegt (Abb.12).

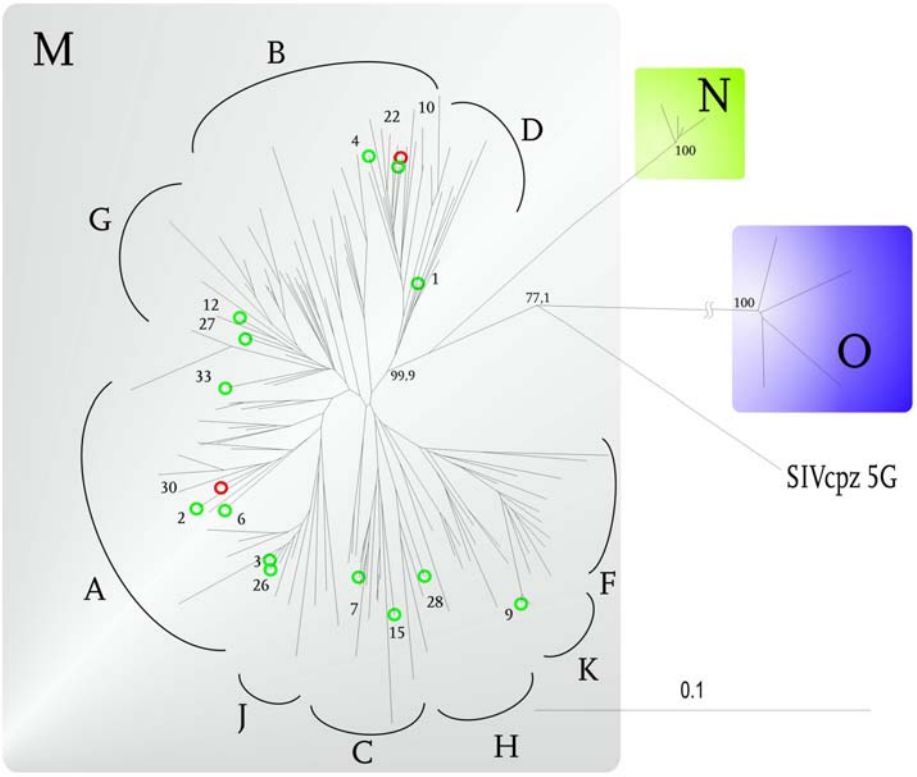


**Abb.14 *Int*-Subtyp der Subtypenreferenzisolate**
840 bp von 16 *int* Sequenzen des Subtypenpanels und 141 Referenzsequenzen (www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html von 2008) wurden mit CLUSTALW aliniert, der *Neighborjoining*-Stammbaum (radiale Baumdarstellung in *treeview*) wurde aus der Distanzmatrix (mit K2P Evolutionsmodell) berechnet. Außengruppe SIVcpz5Gabun, Zahlen an den Knoten: Bootstrapwerte. Bootstrapwerte für die Subtypen innerhalb der Gruppe M sind aus Übersichtsgründen nicht eingetragen. Die Subtypen der M-Gruppe: runde Klammern, *int* Sequenzen des Subtypreferenzpanels grüne Kreise, Isolate F-10 und D-30 rote Kreise, Zweige ohne Markierung Subtypenreferenzsequenzen aus der HIV-Datenbank

**Tab.11 Übersicht Subtypenpanel**

| *pol*-Subtyp | Lab.Nr. | *int*-Subtyp | Überstand von Tag | Neben-banden | Viruslast geq/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| **A** | **2** | A1 | 10 | nein | 2,57E+09 |
| **A** | **6** | A2 | 13 | nein | 8,62E+08 |
| **CRF01_AE** | **3** | 01_AE | 20 | nein | 2,01E+07 |
| **CRF01_AE** | **26** | 01_AE | 12 | nein | 2,03E+08 |
| **CRF02_AG** | **33** | 02_AG | 17 | nein | 3,13E+04 |
| **B** | **4** | B | 13 | nein | 1,12E+09 |
| **B** | **22** | B | 22 | nein | 3,05E+08 |
| **C** | **7** | C | 13 | nein | 1,97E+09 |
| **C** | **15** | C | 10 | nein | 1,65E+09 |
| **D** | **1** | D | 10 | nein | 8,45E+09 |
| **D** | **30** | A1 | 12 | nein | 4,36E+07 |
| **F** | **9** | F1 | 13 | (ja)* | 1,56E+09 |
| **F** | **10** | B | 13 | nein | 3,79E+09 |
| **G** | **12** | G | 10 | (ja) | 3,06E+07 |
| **G** | **27** | G | 12 | nein | 3,28E+09 |
| **H** | **28** | H | 12 | nein | 7,94E+08 |

* Nebenbanden in der Wiederholung nicht reproduziert

## 3.4 Validierung der *int* RT-PCR anhand von Patientenproben aus der HIV-1 Serokonverterstudie

Zur Validierung der etablierten *int* RT-PCR wurde ein Patientenpanel aus der HIV-1 Serokonverterstudie des RKI zusammengestellt. Die Patientenproben wurden so ausgewählt, dass alle wichtigen Transmissionsgruppen (Übertragungswege) enthalten waren und die Infektion vor 2008, also vor Verfügbarkeit der Integrase-Inhibitoren erfolgte, sowie dass die Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme Therapie-naiv waren (Tab.3). Das Auswahlkriterium „therapie-naiv“ und Zeitpunkt der Infektion ist wesentlich, da bei dieser Validierung auch die Häufigkeit von natürlichen, nicht resistenz-assoziierten Polymorphismen in der Integrase bestimmt werden sollte. Das Validierungspanel aus 42 Proben enthielt 7 IVDA-Patienten (intravenöser Drogenanwender), 12 Patienten mit heterosexuellem Infektionsrisiko, 6 Patienten aus Hochprävalenz-Ländern (HPL) und 17 MSM (Männer, die Sex mit Männern haben), die sich zwischen 2001 und 2007 infiziert hatten (Tab.12). Von allen Proben war bereits die genotypische Resistenz der Protease und RT bestimmt, sowie der Subtyp aus der pol-Sequenz analysiert worden. Es waren 36 Subtyp B Infektionen nach der *pol*-Sequenz, und je 3 Infektionen mit CRF01_AE und CRF02_AG, die im Serokonverterkollektiv die häufigsten „non-B“-Viren sind (Poggensee et al. 2007).

Alle Proben konnten mit der *int* RT-PCR amplifiziert werden (Tab.12). Eine der 42 Proben war nur schwach positiv, so dass keine Sequenzierung möglich war. Die Sequenzierung der verbleibenden 41 *int* RT-PCR Produkte war ebenfalls erfolgreich (Tab.12). Zusätzlich wurde die Viruslast mit der LTR-TaqMan RT-PCR bestimmt (39/42 Proben). Zwei der Proben wiesen keine quantifizierbare Viruslast auf (Tab.12), obwohl sie *int* RT-PCR positiv waren, während in den anderen Proben Viruslasten zwischen $10^3$ bis $10^7$ geq/ml vorlagen.

Die Subtypanalyse der 41 Integrase-Sequenzen aus den Plasmaviren im *Neighborjoining*-Verfahren ergab, dass der *int*-Subtyp mit dem jeweiligen Subtyp der *pol*-Sequenz (Protease und RT) übereinstimmte (Tab.12, Abb.15). Im *Neighborjoining*-Stammbaum (Abb.15) fallen drei Sequenzpaare auf, die sich durch eine geringe paarweise Divergenz von den anderen viralen Sequenzen unterscheiden. Die nahe Verwandtschaft sowie die hohe Signifikanz des Knotens vom dem sie abzweigen, weisen auf ein Transmissionscluster hin.

**Tab.12 Charakteristika des Patientenpanels zur Validierung der *int* RT-PCR**

| Transmissions-gruppe | sCount | PCR | *Int* Seq. | Integrase-Subtyp | Viruslast geq/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| Hetero | 01-00269 | positiv | ok | B | n.d.* |
| Hetero | 02-00086 | positiv | ok | B | 7,40E+05 |
| IVDA | 02-00641 | positiv | ok | B | <100 |
| MSM | 02-00695 | positiv | ok | B | 2,04E+06 |
| MSM | 03-00049 | positiv | ok | B | n.d. |
| MSM | 03-00053 | positiv | ok | B | 8,01E+06 |
| MSM | 03-00140 | positiv | ok | B | n.d. |
| MSM | 03-00148 | positiv | ok | B | 3,07E+07 |
| MSM | 03-00193 | positiv | ok | B | <100 |
| MSM | 03-00233 | positiv | ok | B | 4,53E+07 |
| MSM | 03-00248 | positiv | ok | B | 2,05E+07 |
| BIVDA | 03-00336 | (positiv) | n.d. | n.d. | <100 |
| Hetero | 04-00018 | positiv | ok | B | 1,34E+06 |
| MSM | 04-00255 | positiv | ok | B | 2,80E+03 |
| MSM | 04-00290 | positiv | ok | B | n.d. |
| IVDA | 04-00384 | positiv | ok | B | 2,48E+05 |
| MSM | 04-00496 | positiv | ok | B | 1,80E+08 |
| HPL | 04-00497 | positiv | ok | CRF02_AG | 1,71E+05 |
| MSM | 04-00518 | positiv | ok | B | 4,64E+06 |
| IVDA | 04-00540 | positiv | ok | B | 6,53E+04 |
| Hetero | 04-00542 | positiv | ok | B | 7,66E+04 |
| IVDA | 04-00653 | positiv | ok | B | 2,52E+05 |
| MSM | 04-00670 | positiv | ok | B | 1,30E+07 |
| Hetero | 05-00084 | positiv | ok | B | 4,39E+04 |
| IVDA | 05-00104 | positiv | ok | B | 7,49E+06 |
| Hetero | 05-00123 | positiv | ok | B | 5,89E+05 |

| Transmissions-gruppe | sCount | PCR | *Int* Seq. | Integrase-Subtyp | Viruslast geq/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| Hetero | 05-00310 | positiv | ok | B | 4,92E+05 |
| Hetero | 05-00339 | positiv | ok | B | 3,06E+07 |
| MSM | 05-00492 | positiv | ok | B | 3,51E+07 |
| Hetero | 05-00513 | positiv | ok | B | 2,33E+06 |
| MSM | 05-00516 | positiv | ok | B | 1,32E+04 |
| MSM | 05-00638 | positiv | ok | B | 7,80E+07 |
| MSM | 05-00764 | positiv | ok | B | 1,89E+07 |
| IVDA | 05-00938 | positiv | ok | B | 1,37E+06 |
| HPL | 05-01160 | positiv | ok | CRF01_AE | 4,52E+06 |
| IVDA | 05-01173 | positiv | ok | B | 8,23E+05 |
| HPL | 06-00006 | positiv | ok | CRF02_AG | 4,69E+07 |
| HPL | 06-00368 | positiv | ok | CRF01_AE | 4,26E+05 |
| HPL | 06-00524 | positiv | ok | CRF01_AE | 2,94E+06 |
| Hetero | 06-00536 | positiv | ok | B | 3,38E+05 |
| Hetero | 06-00672 | positiv | ok | B | 6,80E+04 |
| Hetero | 06-00793 | positiv | ok | B | 1,42E+07 |
| HPL | 07-00138 | positiv | ok | CRF02_AG | 4,46E+06 |

Grün markierte Probe schwach positiv, aufgrund zu niedriger DNA-Menge nicht sequenzierbar
*n.d . nicht durchgeführt

Zur Identifikation resistenz-assoziierter Mutationen und natürlicher Polymorphismen wurden die *int*-Sequenzen mit Hilfe des Stanford-Vorhersagealgorithmus analysiert (hivdb.stanford.edu). Das Webtool aliniert die hochgeladene Sequenz gegen eine Konsensus B-Sequenz und gibt die identifizierten primären (majoritären) und sekundären (minoritären) Resistenzmutationen der Integrase in einem Resistenzreport zurück. Zusätzlich werden alle nicht resistenz-assoziierten Aminosäureaustausche in dem Report gelistet. Die identifizierten Mutationen wurden in einer Exceltabelle erfasst und ihre Häufigkeiten bestimmt.

In keiner der 41 Sequenzen wurde eine primäre Resistenzmutation an den Positionen 143, 148 und 155 gegen Raltegravir identifiziert. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da alle Patienten Therapie-naiv waren und ihr Infektionszeitpunkt vor Beginn der Verwendung von Raltegravir in antiretroviralen Kombinationstherapien lag.

Minoritäre Resistenzmutationen wurden jedoch identifiziert: L74M, T97AT, V151I, S153AS, M154I, I203M. Unter diesen kam die M154I Mutation sogar in einer Häufigkeit über 10% vor (Tab.13). Neben dieser minoritären Resistenzmutation wurden an 28 weiteren nicht resistenz-assoziierten Positionen Aminosäureaustausche in einer Häufigkeit ≥ 10% identifiziert (Tab.13). Die Häufigkeitsgrenze von 10% wurde willkürlich

gezogen, um die Daten übersichtlich darstellen zu können und in der Annahme, dass häufig beobachtete Mutationen für die Funktionalität der Integrase von Bedeutung sind.

Da es bekannt ist, dass die HIV-1 Subtypen sich durch subtyp-spezifische Polymorphismen unterscheiden, wurden die identifizierten Substitutionen auch getrennt nach Subtyp B und non-B analysiert (Tab.13). Die non-B-Subtypen wurden aufgrund der kleinen Anzahl in einer Gruppe zusammengefasst. Bei diesem Vergleich wurden 8 Positionen identifiziert (14, 31, 112, 126, 135, 136), an denen in den non-B-Subtypen signifikant gehäuft andere Aminosäuren als in Subtyp B vorlagen (Tab.13).

**Tab.13** **Vergleich der Mutationshäufigkeiten in der Integrase insgesamt und in Abhängigkeit des HIV-Subtyps**

| Mutation | Gesamt | | Sub B | | non-B | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| >10% | %* | n=42 | % | n=36 | % | n=6 | p |
| E10DV | 19,0 | (8) | 25,0 | (9) | 0,0 | (0) | |
| E11D | 16,7 | (7) | 27,8 | (10) | 16,7 | (1) | |
| K14KR | 16,7 | (7) | 8,3 | (3) | 83,3 | (5) | <0,05[1] |
| S17N | 11,9 | (5) | 13,9 | (5) | 0,0 | (0) | |
| A21ST | 16,7 | (7) | 13,9 | (5) | 50,0 | (3) | |
| V31IMV | 23,8 | (10) | 16,7 | (6) | 83,3 | (5) | <0,05 |
| V32I | 9,5 | (4) | 11,1 | (4) | 16,7 | (1) | |
| S39CN | 9,5 | (4) | 5,6 | (2) | 33,3 | (2) | |
| M50IT | 14,3 | (6) | 16,7 | (6) | 16,7 | (1) | |
| I72V | 35,7 | (15) | 41,7 | (15) | 83,3 | (5) | |
| L101IV | 26,2 | (11) | 25,0 | (9) | 66,7 | (4) | |
| K111NRT | 9,5 | (4) | 8,3 | (3) | 16,7 | (1) | |
| T112AIV | 23,8 | (10) | 16,7 | (6) | 100,0 | (6) | <0,05 |
| I113V | 9,5 | (4) | 13,9 | (5) | 0,0 | (0) | |
| S119GPRST | 28,6 | (12) | 36,1 | (13) | 16,7 | (1) | |
| T122I | 21,4 | (9) | 22,2 | (8) | 16,7 | (1) | |
| T124ANQ | 57,1 | (24) | 58,3 | (21) | 100,0 | (6) | |
| T125ATV | 40,5 | (17) | 38,9 | (14) | 100,0 | (6) | |
| V126LM | 9,5 | (4) | 11,1 | (4) | 16,7 | (1) | |
| G134DN | 14,3 | (6) | 0,0 | (0) | 100,0 | (6) | <0,05 |
| I135V | 21,4 | (9) | 11,1 | (4) | 100,0 | (6) | <0,05 |
| K136RT | 14,3 | (6) | 0,0 | (0) | 100,0 | (6) | <0,05 |
| **M154I** | 11,9 | (5) | 13,9 | (5) | 0,0 | (0) | |
| K156N | 7,1 | (3) | 11,1 | (4) | 0,0 | (0) | |
| G193ER | 11,9 | (5) | 16,7 | (6) | 0,0 | (0) | |
| V201IV | 45,2 | (19) | 47,2 | (17) | 100,0 | (6) | |
| T206S | 9,5 | (4) | 2,8 | (1) | 50,0 | (3) | <0,05 |
| L234IV | 21,4 | (9) | 11,1 | (4) | 100,0 | (6) | <0,05 |
| D256E | 16,7 | (7) | 25,0 | (9) | 0,0 | (0) | |

*nur Häufigkeiten ≥10% sind gelistet
minoritäre Resistenzmutation: grün markiert
[1] Signifikanz nach Fischer Exakt-Test, Konfidenzintervall 95%, zweiseitig

In einem weiteren Schritt wurden die Mutationshäufigkeiten in Abhängigkeit des HIV-Übertragungsweges (Transmissionsgruppe) analysiert (Abb.13). An fünf der minoritären

Resistenzpositionen wurden resistenz-assoziierte Polymorphismen beobachtet. Ausschließlich bei Patienten aus HIV-Endemiegebieten (HPL) wurde L74M und T79A beobachtet, während V151I nur bei Patienten aus Endemiegebieten nicht vorkam. M154V wurde nur in heterosexuell übertragenen Infektionen und bei IVDA-Patienten identifiziert. Die Mutation I203M dagegen wurde nie bei heterosexuell übertragenen Infektionen und IVDA beobachtet, sondern nur in MSM und Patienten aus Endemiegebieten.

Besonders gehäuft (>40%) traten 1-3 Polymorphismen an den Positionen 21, 31, 72, 101, 112, 124, 125, 134, 135, 136, 201, 206 und 234 in Patienten aus Endemiegebieten auf. In HIV aus IVDA-Patienten waren die Position 10, 11, 21, 72 und 124 auffällig polymorph. Heterosexuell infizierte Patienten hatten häufig 1-3 Substitutionen an den Positionen 124, 125 und 201, während in MSM die Positionen 119, 124 und 125 von der Subtyp B Konsensus-Sequenz abwichen. Die Polymorphismen T124ANQ und T125AMV lagen demzufolge bei allen Transmissionsgruppen häufig vor.

Diese Auswertung ist (noch) mit Vorbehalt zu bewerten, da teilweise zu geringe Fallzahlen pro Transmissionsgruppe und beobachteten Aminosäuresubstitutionen vorliegen, um die Signifikanz der Unterschiede zu bewerten.

## Tab.14 Vergleich der Polymorphismen unter den Transmissionsgruppen

| Mutation | MSM | | Hetero | | IVDA | | HPL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| >10% | % | n=17 | % | n=12 | % | n=7 | % | n=6 |
| D6E | -[1] | | 8,3 | (1) | 28,6 | (2) | - | |
| K7R | 5,9 | (1) | 8,3 | (1) | - | | 16,7 | (1) |
| E10DV | 11,8 | (2) | 25,0 | (3) | 57,1 | (4) | - | |
| E11D | 17,6 | (3) | 33,3 | (4) | 42,9 | (3) | 16,7 | (1) |
| E13D | - | | - | | - | | 16,7 | (1) |
| K14R | 5,9 | (1) | 8,3 | (1) | 14,3 | (1) | 83,3 | (5) |
| S17N | 17,6 | (3) | 8,3 | (1) | 14,3 | (1) | - | |
| R20K | 17,6 | (3) | - | | - | | - | |
| A21TS | - | | 16,7 | (2) | 42,9 | (3) | 50,0 | (3) |
| A23V | - | | - | | 28,6 | (2) | 16,7 | (1) |
| S24DN | 5,9 | (1) | 8,3 | (1) | 14,3 | (1) | - | |
| N27H | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| L28I | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| V31IMV | 23,5 | (4) | 16,7 | (2) | - | | 83,3 | (5) |
| V32I | 5,9 | (1) | 25,0 | (3) | - | | 16,7 | (1) |
| S39N | 11,8 | (2) | - | | - | | 33,3 | (2) |
| D41DN | - | | - | | 14,3 | (1) | 16,7 | (1) |
| K42KR | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| E48EK | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| M50IT | 5,9 | (1) | 25,0 | (3) | 28,6 | (2) | 16,7 | (1) |
| G59EGR | 11,8 | (2) | - | | - | | - | |
| G70EG | - | | 16,7 | (2) | 14,3 | (1) | - | |
| K71KQ | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| I72V | 17,6 | (3) | 75,0 | (9) | 42,9 | (3) | 83,3 | (5) |
| **L74M** | - | | - | | - | | 33,3 | (2) |
| **T97AT** | - | | - | | - | | 16,7 | (1) |
| L101IV | 35,3 | (6) | 25,0 | (3) | - | | 66,7 | (4) |
| K111NRT | 17,6 | (3) | - | | - | | 16,7 | (1) |
| T112AIV | 11,8 | (2) | 16,7 | (2) | 28,6 | (2) | 100,0 | (6) |
| I113V | 11,8 | (2) | 25,0 | (3) | - | | - | |
| S119GRPT | 41,2 | (7) | 33,3 | (4) | 28,6 | (2) | 16,7 | (1) |
| T122I | 17,6 | (3) | 25,0 | (3) | 28,6 | (2) | 16,7 | (1) |
| T124ANQ | 76,5 | (13) | 41,7 | (5) | 42,9 | (3) | 100,0 | (6) |
| T125AMV | 41,2 | (7) | 41,7 | (5) | 28,6 | (2) | 100,0 | (6) |
| V126LM | 11,8 | (2) | 16,7 | (2) | - | | 16,7 | (1) |
| G134DN | - | | - | | - | | 100,0 | (6) |
| I135V | 11,8 | (2) | 16,7 | (2) | - | | 100,0 | (6) |
| K136RT | - | | - | | - | | 100,0 | (6) |
| **V151I** | 5,9 | (1) | 8,3 | (1) | 14,3 | (1) | - | |
| **M154I** | - | | 8,3 | (1) | 57,1 | (4) | - | |
| K156N | 17,6 | (3) | 8,3 | (1) | - | | - | |
| G163ES | 5,9 | (1) | 16,7 | (2) | - | | 16,7 | (1) |
| D167E | 5,9 | (1) | - | | - | | 50,0 | (3) |
| H171Y | - | | - | | - | | 16,7 | (1) |
| F181LY | - | | 8,3 | (1) | - | | 33,3 | (2) |
| K188R | 5,9 | (1) | - | | 14,3 | (1) | - | |
| I191L | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| G193ER | 23,5 | (4) | 16,7 | (2) | - | | - | |
| V201I | 35,3 | (6) | 50,0 | (6) | 71,4 | (5) | 100,0 | (6) |
| **I203M** | 5,9 | (1) | - | | - | | 16,7 | (1) |
| T206S | 5,9 | (1) | - | | - | | 50,0 | (3) |
| I208L | 5,9 | (1) | - | | 28,6 | (2) | - | |
| K211R | - | | - | | - | | 16,7 | (1) |
| Q216N | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| K219N | - | | 8,3 | (1) | - | | 16,7 | (1) |
| I220L | 5,9 | (1) | 8,3 | (1) | - | | - | |
| L234IV | 5,9 | (1) | 16,7 | (2) | 14,3 | (1) | 100,0 | (6) |
| I251V | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| D253E | - | | - | | 14,3 | (1) | - | |
| D256E | 23,5 | (4) | 33,3 | (4) | 14,3 | (1) | - | |
| R269K | - | | - | | - | | 16,7 | (1) |

Grün markiert sind sekundäre Resistenzmutationen

[1] steht für 0%

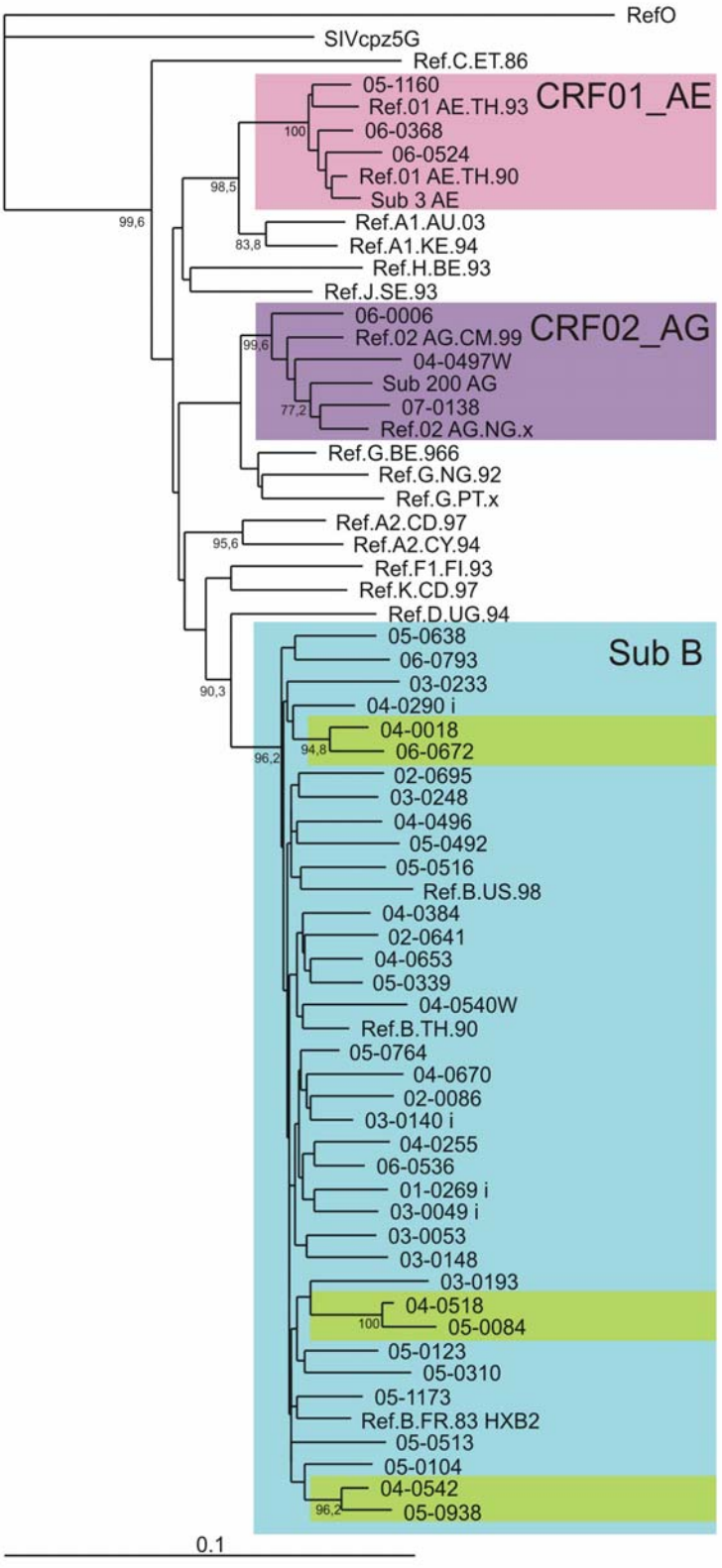


**Abb.15 Subtypbestimmung der *int*-Sequenzen des Patientenprobenpanels**
Alignment mit 41 Patientensequenzen und 22 Subtypreferenzsequenzen, DNADist mit K2P, *Neighborjoining*-Stammbaum basierend auf 840 bp der Integrase-Sequenz, Außengruppe SIVcpz 5Gabun), Bootstrapwerte >70% Violett CRF01_AE, Purpur CRF02_AG, Blau Subtyp B, Grün: Transmissionscluster. Die Nummern an den Ästen entsprechen den Probennummern in Tab.12.

## 3.5 Externe Qualitätskontrolle zur Durchführung der *int* RT-PCR

Die Teilnahme an Ringversuchen zur externen Qualitätssicherung diagnostischer Verfahren ist für Diagnostiklabore von essentieller Bedeutung, insbesondere wenn es sich um nicht kommerzielle Testverfahren handelt.

In einem ersten Ringversuch mit internationalen Teilnehmern wurden 23 Proben zur Untersuchung in der nicht kommerziellen *int* RT-PCR erhalten. Jeder Teilnehmer sollte sein etabliertes und validiertes Verfahren verwenden. Es sollte geprüft werden, welche Proben PCR-positiv waren. Bekannt war nur, dass verschiedene Subtypen und eine Verdünnungsreihe in dem Probenpanel enthalten waren. Von sieben Proben mußte die Integrase-Sequenz ermittelt werden.

**Tab.15 *int*-RT-PCR Ergebnisse und Sequenzierung der Ringversuchproben**

| sCount | Isolat-bezeichnung | PCR: | Sequenzierung | Subtyp | minoritäre Resisitenzmut. | Vorhergesagter Phänotyp |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **09-4065** | Int-01_9009 | positiv | **erfolgreich** | A1 | | sensitiv |
| **09-4066** | Int-02_9009 | negativ | | | | |
| **09-4067** | Int-03_9009 | positiv | | | | |
| **09-4068** | Int-04_9009 | negativ | | | | |
| **09-4069** | Int-05_9009 | positiv | | | | |
| **09-4070** | Int-06_9009 | negativ | | | | |
| **09-4071** | Int-07_9009 | positiv | **erfolgreich** | C | | sensitiv |
| **09-4072** | Int-08_9009 | negativ | | | | |
| **09-4073** | Int-10_9009 | positiv | | | | |
| **09-4074** | Int-11_9009 | positiv | | | | |
| **09-4075** | Int-12_9009 | positiv | **erfolgreich** | D | | sensitiv |
| **09-4076** | Int-13_9009 | positiv | | | | |
| **09-4077** | Int-14_9009 | positiv | **erfolgreich** | B | M154I | sensitiv |
| **09-4078** | Int-15_9009 | positiv | **erfolgreich** | CRF12_BF | G163R | sensitiv |
| **09-4079** | Int-16_9009 | positiv | | | | |
| **09-4080** | Int-17_9009 | negativ | | | | |
| **09-4081** | Int-19_9009 | positiv | | | | |
| **09-4082** | Int-20_9009 | positiv | **erfolgreich** | CRF06_cpx | | sensitiv |
| **09-4083** | Int-21_9009 | positiv | | | | |
| **09-4084** | Int-22_9009 | negativ | | | | |
| **09-4085** | Int-23_9009 | positiv | **erfolgreich** | G | G140EG | sensitiv |
| **09-4086** | Int-24_9009 | positiv | | | | |
| **09-4087** | Int-25_9009 | negativ | | | | |

Von den 23 Ringversuchsproben waren 16 in der *int* RT-PCR positiv getestet. Alle für die Sequenzierung angegebenen Proben konnten erfolgreich sequenziert werden. Erarbeitete Elektrophoresebilder sowie benötigte Sequenzdaten wurden an das auswertende Institut in Utrecht, Niederlande gesandt.

Der Subtyp der sieben *int*-Sequenzen wurde phylogenetisch analysiert (Abb17, Appendix). Davon wurden insgesamt die Subtypen A1, B, C, D, G, CRF06_cpx, und CRF12_BF identifiziert (Tab.15).

# 4 Diskussion

Obwohl die Resistenzentwicklung gegen antiretrovirale Medikamente durch den Einsatz moderner Medikamentenkombinationen reduziert werden konnte, kommt es unter suboptimalen Medikamentenspiegeln zur Selektion resistenter Virusvarianten. Besitzen diese resistenten Viren zudem eine effiziente virale Fitness, können sie auch ohne Selektionsvorteil persistieren und weiter übertragen werden. Ein regelmäßiges Monitoring der Patienten unter Therapie ist deshalb für die Beurteilung des Therapieansprechens wichtig. Zeichnet sich ein Therapieversagen durch Wiederanstieg der Viruslast ab, ist es nötig, die Resistenzeigenschaften von HIV zu bestimmen und die Therapie genotypgerecht umzustellen. Daher war es nötig, für das erst kürzlich zugelassene Medikament Raltegravir (RAL), das erste Medikament aus der neuen Wirkstoffklasse der Integrase-Inhibitoren, für die es noch keinen kommerziellen genotypischen Resistenztest gibt, einen *inhouse*-Test zu etablieren, um damit die Studienpatienten untersuchen zu können.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Validierung einer genotypischen Resistenztestung der HIV-Integrase auf der Basis von RT-PCR-Amplifikaten von Plasmaviren. In empirischen Studien wurden primäre und minoritäre Resistenzmutationen in der Integrase mit phänotypischer oder klinischer Resistenz korreliert, so dass die Identifikation der Mutationen in der Sequenz der *int* RT-PCR Amplifikaten eine Vorhersage der erwarteten Resistenz erlaubt. Drei Schlüsselpositionen mit definierten Aminosäuresubstitutionen vermindern die Wirksamkeit von Raltegravier drastisch (Y143RC, Q148HRK und N155H). Definierte Mutationen an mindestens acht weiteren Positionen (66, 92, 121, 138, 140, 147, 153 und 263) verursachen niedrigere RAL-Resistenz oder verstärken sie (Tab.1).

## 4.1 Sensitivität der *int* RT-PCR

Die Etablierung der *int* RT-PCR im Labor wurde ausgehend von einem Protokoll eines Kooperationspartners (Dr. Rolf Kaiser, Virologisches Institut der Universität Köln) der Arbeitsgruppe begonnen. Die Nachweisgrenze für Subtyp B wurde anhand eines Konzentrationsstandards (Referenzvirus mit bekannten Konzentrationen) bestimmt. Die Sensitivität für Subtyp B mit 457 geq/ml (+/- 260 geq/ml) wurde als ausreichend erachtet, so dass keine weitere Optimierung des RT-PCR Protokolls vorgenommen wurde.

## 4.2 Subtyp-generische Amplifikation der *int*-Region mit unterschiedlicher Sensitivität

Anhand eines Subtypenreferenzpanels wurde überprüft, ob und wie sensitiv verschiedene Subtypen mit dieser RT-PCR nachgewiesen werden können. Virusstocks von je 1-2 Isolaten der Subtypen A, B, C, D, F, G und H sowie der rekombinanten HIV CRF01_AE, CRF02_AG wurden quantifiziert und die jeweilige Nachweisgrenze der *int* RT-PCR bestimmt. Für die Subtypen A, B, D, G, H und die rekombinanten Viren des Panels wurde eine als ausreichend bewertete Nachweisgrenze zwischen 550 und 10.000 geq/ml erreicht.

Es zeigte sich jedoch, dass die Subtypen C und F mit einer 100 (F) bis 1.000 (C) fach geringeren Sensitivität als die anderen Referenzviren nachgewiesen werden konnten. Eine Ursache für die geringere Sensitivität könnten subtyp-spezifische Divergenzen an den Primerbindungstellen sein. Die HIV-Sequenzen, an die die RT-PCR Primer hybridisieren, wurde daher in einem Alignment von Subtypenreferenzsequenzen überprüft (Daten nicht gezeigt). Der PCR-Primer 5'-INT zeigte bei verschiedenen Isolaten des Subtyps C vereinzelte Nukleotid-Austausche im Bereich des 3'-Endes des Primers. Diese führen vermutlich dazu, dass dieser Primer bei der spezifischen Annealingtemperatur in der PCR weniger stabil hybridisiert und somit die Initiationsrate der DNA-Synthese in der PCR reduziert wird. Für den Subtyp F wurden solche Primer-Fehlbindungen nicht im Konsensus-Alignment identifiziert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Zellkulturvermehrung der Referenzviren im Labor zufällig Mutationen an den Primerbindungsstellen aufgetreten sind, die eine schlechtere PCR-Effizienz bewirken. Dafür spricht auch, dass die Subtyp B Referenzisolate im Gegensatz zu dem molekularen Klon NL4.3 ca. 100fach schlechter amplifiziert wurden. Um solche Mutationen auszuschließen, müssten die entsprechenden Sequenzabschnitte in den Referenzviren zur Kontrolle sequenziert werden. Eine Modifikation der Primersequenzen für Subtyp C würde wahrscheinlich die Sensitivität erhöhen, allerdings ist eine Verringerung der Sensitivität bei den anderen Subtypen dadurch nicht ausgeschlossen. Eine Verwendung von degenerierten Primern, die Fehlbindungen in dem Primer-DNA-Hybrid in gewissem Maße kompensieren, könnte zur Verbesserung der Amplifikationseffizienz für die verschiedenen HIV-1 Subtypen beitragen.

Zur Bestimmung der Sensitivität für die Subtypen wurden im Vergleich zu NL4.3 weniger unabhängige Wiederholungen derselben Probe untersucht, so dass eine größere Streuung der Messergebnisse beobachtet wurde. Es fällt auf, dass verschiedene Isolate desselben Subtyps auch eine unterschiedliche Amplifikationseffizienz aufweisen. Diese Unterschiede sind vermutlich durch Sequenzvarianzen in den Primerbindungsstellen verursacht. Mehr Wiederholungen und die Verwendung weiterer Isolate pro Subtyp sind nötig, um die beobachteten Unterschiede abzusichern.

## 4.3 Subtypbestimmung anhand der Integrasesequenzen

Aus genomischen Sequenzen können nicht nur Informationen über resistenz-assoziierte Mutationen, gewonnen werden, sondern sie können bei ausreichender Länge (ausreichende Menge von Merkmalsunterschieden) auch auf ihre phylogenetische Verwandtschaft untersucht werden.

Die *int*-Sequenzen der Subtypenreferenzisolate wurden mit Subtypenreferenzsequenzen aus Sequenzdatenbanken aliniert und in einer *Neighborjoining*-Analyse wurde ihr Subtyp ermittelt. Anhand der *int*-Referenzsequenzen aus der Datenbank zeigte sich, dass das *int*-Fragment von 840 bp ausreichend lang ist, um eine phylogenetische Unterscheidung der bekannten Subtypen zu erreichen. Alle definierten Subtypen waren in den erwarteten signifikanten *Clades* (monophyletischen Gruppen) lokalisiert. Einige der klassifizierten zirkulierenden rekombinanten Formen wiesen jedoch keine Lokalisation in CRF-spezifischen *Clades* auf. Möglicherweise ist der analysierte Sequenzbereich zu kurz, um eine eindeutige *Clade*-Zuordnung zu erhalten. Eine andere Erklärung hierfür lieferte eine detaillierte Analyse der rekombinanten Genstruktur der definierten CRF (www.hiv.lanl.gov). Dabei stellte sich heraus, dass in dem Integrase-Leserahmen Rekombinationsstellen zwischen zwei Subtypsegmenten vorliegen (***breakpoints).*** In Bezug auf das verwendete Subtypenreferenzpanel muss festgehalten werden, dass zwei *int*-Fragmente (Isolat F_10 und D_30) nicht dem Subtyp entsprachen, der in der phylogenetischen Analyse anderer Genombereiche bestimmt worden war. Entweder liegen in diesen Viren ebenfalls rekombinante Genomstrukturen vor oder bei der Virusvermehrung im Labor haben im Vorfeld der Arbeit Probenverwechslungen stattgefunden. Zur Aufklärung sollte eine erneute Vermehrung aus asservierten Primärstocks erfolgen und der Subtyp der *int*-Sequenz überprüft werden. Für die Bestimmung der subtyp-spezifischen Nachweisgrenze wurde hier der ermittelte und nich der erwartete *int*-Subtyp verwendet.

## 4.4 Validierung der *int* RT-PCR an einem Patientenpanel

Von 42 Patienten der HIV-1 Serokonverterstudie, waren alle Proben RT-PCR positiv, deshalb hat *int* RT-PCR eine Sensitivität von 100%. Eine Probe des Panels war schwach positiv, so dass eine Sequenzanalyse nicht möglich war. Durch Reamplifikation des PCR-Produktes könnte man aber auch diese Probe noch weiter untersuchen. Zur Beurteilung der Spezifität müssten HIV-negative Proben untersucht werden. Dies wurde aus Zeitgründen unterlassen. Es ist jedoch aufgrund des spezifischen Primerdesigns davon auszugehen, dass keine humanen RNA-Sequenzen und auch keine HIV-2 Sequenzen mit diesen Primern amplifizierbar sind.

Die sechs non-B Subtypen, die in diesem Probenpanel enthalten waren, konnten ebenfalls nachgewiesen und ihre Übereinstimmung mit dem *pol*-Subtyp gezeigt werden. Dieses Ergebnis sowie auch die Tatsache, dass in dem Ringversuchspanel (externe Qualitätssicherung, Bewertung steht noch aus) non-B Subtypen erfolgreich amplifiziert wurden, unterstreicht die Aussage, dass die etablierte *int* RT-PCR Subtyp-generisch ist.

## 4.5 Analyse der Resistenzmutationen gegen Integrase-Inhibitoren

In den *int*-Sequenzen der 41 Patienten konnten keine der drei Hauptresistenzmutationen gegen Raltegravir beobachtet werden (Stanford-Vorhersage-Tool für Resistenz gegen Integrase-Inhibitoren, hivdb.stanford.edu). Da ausschließlich therapie-naive Patienten untersucht wurden, die sich vor der Zulassung von Raltegravir (Handelsname: Isentress®) infiziert hatten, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Entdeckt wurden jedoch Resistenzmutationen, die als minoritäre resistenz-assoziierte Mutationen charakterisiert wurden: L74M, T79AT, V151I, S153AS, M154I und I203M. Von diesen weiß man, dass sie alleine eine geringe Resistenz verursachen oder in Kombination mit den Hauptmutationen die Resistenz verstärken. Unter diesen war die Mutation M154I besonders häufig (11.9%). Diese wurde erstmals durch *in vitro* Selektion mit pre-RAL/EVG beschrieben und stand im Verdacht, mit Resistenzen assoziiert zu sein (Hazuda *et al*. 2000; Hazuda *et al*. 2004). Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Bachelorarbeit. Aufgrund der Auswahl der Patienten und ihrem

therapie-naiven Status, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Mutationen natürliche Polymorphismen und nicht resistenz-assoziiert sind. Für die Mutation M154I fanden andere Arbeitsgruppen ebenfalls keine Assoziationen mit RAL-Resistenz (Rowley 2008, Low *et al.* 2009). Für die Mutationen L74M und T97A konnte nachgewiesen werden, dass sie in Kombination mit N155H eine verringerte Wirksamkeit von RAL verursachen (Hazuda *et al*. 2007). Weitere Mutationen, die zwar bei Medikation mit RAL auftraten und bei denen bisher keine Effekte auf die Wirksamkeit von RAL beobachtet wurden sind die Mutationen V151I und I203M (Hazuda *et al*. 2004, Malet *et al*. 2008).

## 4.6 Subtyp-spezifische Polymorphismen in der Integrase

Im Vergleich zur hypervariablen Hüllproteinregion ist die *pol*-Region, die für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase kodiert, relativ konserviert. Daher ist es bemerkenswert, dass immerhin 28 nicht resistenz-assoziierte Positionen natürliche Polymorphismen mit einer Häufigkeit von mehr als 10% aufwiesen. Aus dem Vergleich der Häufigkeit der Polymorphismen bei Subtyp B und non-B Viren ergibt sich ein erster signifikanter Hinweis, dass es auch in der Integrase subtyp-spezifische Polymorphismen gibt. Ob diese Polymorphismen für die Resistenzentwicklung von Bedeutung sind, wie es beispielsweise für die Resistenzmutation an Position 106 der Reversen Transkriptase gegen NNRTI im Vergleich von Subtyp C und B gezeigt wurde (hivdb.stanford.edu), erfordert die Analyse größerer Fallzahlen. Der Vergleich der Häufigkeiten von sekundären Resistenzmutationen und Polymorphismen in Abhängigkeit des Übertragungsweges weist ebenfalls auf subtyp-spezifische Mutationsmuster hin. Patienten aus Endemiegebieten sind meist mit non-B HIV-1 Subtypen infiziert, während bei MSM die B-Subtypen überwiegen. Die Tatsache, dass L74M und T79A nur bei Patienten aus HPL beobachtet wurden, könnte auf dem Subtyp beruhen. Für die Vergleiche von Viren in verschiedenen Transmissionsgruppen sollte also immer der Subtyp bestimmt und in der Analyse berücksichtigt werden.

## 4.7 Ausblick

Es wurde eine sensitive, subtypgenerische *int* RT-PCR etabliert und validiert. Um jedoch eine vergleichbare Sensitivität des Nachweises der unterschiedlichen Subtypen zu abzusichern bzw. zu erreichen (Subtyp F und C), müssen noch mehr Isolate der ver-

schiedenen Subtypen untersucht werden und die RT-PCR-Primer möglicherweise modifiziert werden. Zur Unterscheidung von resistenz-assoziierten Mutationen, resistenz-assoziierten Polymorphismen und nicht resistenz-assoziierten Polymorphismen kann die repräsentative Untersuchung therapie-naiver Patienten, die sich vor 2008 infiziert haben, im Vergleich zu Raltegravir-therapierten Patienten beitragen.

# 5 Zusammenfassung

Obwohl die Resistenzentwicklung gegen antiretrovirale Medikamente durch den Einsatz moderner Kombinationstherapien reduziert werden konnte, kann es unter suboptimaler Medikation zur Virusreplikation und Selektion von resistenten Virusvarianten kommen. Bei der Therapie von HIV kommen Integrase-Inhibitoren aufgrund ihrer guten Verträglichkeit sowie als Alternative zu PI, NRTI und NNRTI immer häufiger zum Einsatz. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Validierung einer sensitiven subtypgenerischen RT-PCR zur Amplifizierung und Sequenzierung des Integrase-ORF.

Hierzu wurde die RNA mithilfe des QIAamp Viral RNA Mini Extraction Kit extrahiert. Die RT-PCR Primersequenzen sowie das PCR-Protokoll stammten aus der Arbeitsgruppe von Dr. Rolf Kaiser (Virologisches Institut der Universität Köln). Die RT-PCR wurde mit dem QIAGEN OneStep RT-PCR Kitsystem als Einschrittreaktion konzipiert. Das PCR-Fragment besaß eine Größe von 916 bp und wurde nach Sanger sequenziert. Zur Bestimmung der Sensitivität wurde das HIV-1 Isolat NL4.3 des Subtyps B als Konzentrationsstandard genutzt. Zur Überprüfung der subtypgenerischen Amplifikation wurde ein Subtypenpanel aus 16 Isolaten der Subtypen A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE und CRF02_AG zusammengestellt und anhand von seriellen Verdünnungsreihen die Nachweisgrenze ermittelt. Die Viruslast aller Isolate wurde mit einer gruppengenerischen TaqMan Real-time RT-PCR quantifiziert. Ein Patientenpanel sowie die Teilnahme an einem Ringversuch dienten der Validierung des Systems.

Die Sensitivität für Subtyp B NL4.3 wurde mit 457 geq/ml (+/- 260 geq/ml) als ausreichend für genotypische Resistenzanalyse erachtet. Für die Subtypen A, B, D, G, H und die rekombinanten Viren CRF01_AE und CRF02_AG des Panels wurde eine als ausreichend bewertete Nachweisgrenze zwischen 550 und 10.000 geq/ml erreicht. Es zeigte sich, dass die Subtypen C und F mit einer 100 (F) bis 1.000 (C) fach geringeren Sensitivität als die anderen Referenzviren nachgewiesen werden konnten. Für phylogenetische Unterscheidungen der bekannten Subtypen, reichte das sequenzierte 840 bp lange Fragment aus. Die Validierung anhand des Patientenpanels enthüllte eine Reihe von minoritären resistenz-assoziierten Mutationen, welche eher als Polymorphismen anzusehen sind. Durch die Teilnahme an einem internationalen Ringversuch, konnte das System einer externen Qualitätskontrolle unterzogen werden.

# 6 Literaturverzeichnis

**Alian A,** Griner, S.L., Chiang, V., Tsiang, M., Jones, G., Birkus, G., Geleziunas, R., Leavitt, A.D., Stroud, R.M., 2009. Catalytically-active complex of HIV-1 integrase with a viral DNA substrate binds anti-integrase drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 8192–8197

**Allan JS**, Coligan JE, Lee TH, Barin F, Kanki PJ, M'Boup S, McLane MF, Groopman JE, Essex M. 1987. Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. Blood 69(1):331-333.

**Arion D**, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. Biochemistry 37(45):15908-15917.

**Asante-Appiah E**, Skalka AM. HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis. *Adv Virus Res.* 1999;52:351-69.

**Baltimore D**, 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature JID 226:1209-1211.

**Clavel F**, D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.* Science, 1986. 233(4761) Clavel F, Hance AJ. 2004. HIV drug resistance. The New England journal of medicine 350(10):1023-1035.

**Cohen EA**, Subbramanian RA, Gottlinger HG. 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. Current topics in microbiology and immunology 214:219-235.

**Deeks SG**. 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999) 26 Suppl 1:S25-33.

**Deng H**, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature 381(6584):661-666.

**Eigen M**, Biebricher CK. 1988. Sequence Space and Quasispecies Distribution. in: RNA Genetics (Domingo, E., Holland, J.J. und Alhquist, P., Hrsg.), Vol. III, Variability of RNA Genomes, pp. 211-245, CRC Press, Boca Raton, FL.

**Esnouf R**, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D. 1995. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. Nature structural biology 2(4):303-308.

**Esposito D**, Craigie R. HIV integrase structure and function. *Adv Virus Res.* 1999;52:319-33.

**Fauquet CM**, Mayo MA. 2005. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press Inc.,U.S.

**Gaines H**, von Sydow MA, von Stedingk LV, Biberfeld G, Bottiger B, Hansson LO, Lundbergh P, Sonnerborg AB, Wasserman J, Strannegaard OO. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. AIDS (London, England) 4(10):995-999.

**Gallo RC**, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science (New York, NY 224(4648):500-503.

**Gao F**, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature 397(6718):436-441.

**Gelderblom HR**, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. Virology 156(1):171-176.

**Gottlieb MS**, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. The New England journal of medicine 305(24):1425-1431.

**Hammer SM**, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC. 1996. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. The New England journal of medicine 335(15):1081-1090.

**Hazuda DJ**. Inhibitors of human immunodeficiency virus type I integration. Curr Opin HIV AIDS. 2006 May;1(3):212-7. PubMed PMID: 19372811.

**Hazuda DJ**, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, Vacca JP, Handt L, Motzel SL, Klein HJ, Dornadula G, Danovich RM, Witmer MV, Wilson KA, ussey L, Schleif WA, Gabryelski LS, Jin L, Miller MD, Casimiro DR, Emini EA, Shiver JW. Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. Science. 2004 Jul 23;305(5683):528-32. Epub 2004 Jul 8. PubMed PMID: 15247437.

**Hazuda DJ**, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, Espeseth A, Gabryelski L, Schleif W, Blau C, Miller MD. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. Science. 2000 Jan 28;287(5453):646-50. PubMed PMID: 10649997.

**Hirsch MS**, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Demeter LM, Hammer SM, Jacobsen DM, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Vella S, Richman DD. 1998. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. Jama 279(24):1984-1991.

**Jenkins TM**, Esposito,D., Engelman,A. and R. Craigie. 1997. Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photorosslinking. *EMBO J.*.16:6849-6859

**Johnson VA**, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Top HIV Med. 2008 Dec;16 (5) :138-45. Review. Erratum in: Top HIV Med. 2009 Feb-Mar; 17 (1):13. PubMed PMID: 19106428

**Kahn JO**, Walker BD. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. The New England journal of medicine 339(1):33-39.

**Kanki PJ**, Allan J, Barin F, Redfield R, Clumeck N, Quinn T, Mowovondi F, Thiry L, Burny A, Zagury D, et al. 1987. Absence of antibodies to HIV-2/HTLV-4 in six central African nations. AIDS research and human retroviruses 3(3):317-322.

**Kaplan AH**, Manchester M, Swanstrom R. 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. Journal of virology 68(10):6782-6786.

**Katzman M**, and M. Sudol. 1995. Mapping domains of retroviral integrase responsible for viral DNA specificity and target site selection by analysis of chimeras between human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases. *J.Virol.*.69:5687-5696

**Kohl NE**, Emini EA, Schleif WA. 1988. Active HIV protease is required for viral infectivity. Proc Natl Acad Sci USA 85:4686-90.

**Le Grice SF**, Naas T, Wohlgensinger B, Schatz O. 1991. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. The EMBO journal 10(12):3905-3911.

**Levy JA**, HIV and the Pathogenesis of AIDS, Third Edition 2007, American Society for Microbiology, ISBN: 978-1-55581-393-2, Kapitel 5 Seite 109-112, Kapitel 13 Seite 325-327

**Lode PJ**, Ernst,J.A., Kuszewski,J., Hickman,A.B., Engelman,A., Craigie,R., Clore,G.M. and A.M. Gronenborn. 1995. Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry*.34:9826-9833

**Low A**, Prada N, Topper M, Vaida F, Castor D, Mohri H, Hazuda D, Muesing M, Markowitz M. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Oct;53(10):4275-82. Epub 2009 Aug 3. PubMed PMID: 19651917; PubMed Central PMCID: PMC2764199.Low 2009

**Masur H**, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. 1981. An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. The New England journal of medicine 305(24):1431-1438.

**Miyauchi K**, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. Cell. 2009 May 1;137(3):433-44. PubMed PMID: 19410541; PubMed Central PMCID: PMC2696170.

**Neifer S**, Somogyi S, Schlote F, Berg T, Poggensee G, Kuecherer C. 2006. Persistence of a sexually transmitted highly resistant HIV-1: pol quasispecies evolution over 33 months in the absence of treatment. AIDS (London, England) 20(17):2231-2233.

**Panganiban AT**, Temin HM. 1984. The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(24):7885-7889.

**Patel PH**, Jacobo-Molina A, Ding J, Tantillo C, Clark AD, Jr., Raag R, Nanni RG, Hughes SH, Arnold E. 1995. Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. Biochemistry 34(16):5351-5363.

**Perelson AS**, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science (New York, NY 271(5255):1582-1586.

**Plantier JC**, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damon F, Robertson DL, Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med. 2009 Aug;15(8) :871-2. Epub 2009 Aug 2. PubMed PMID: 19648927.

**Poggensee G**, Kücherer C, Werning J, Somogyi S, Bieniek B, Dupke S, Jessen H, Hamouda O; HIV-1 Seroconverter Study Group. Impact of transmission of drug-resistant HIV on the course of infection and the treatment success. Data from the German HIV-1 Seroconverter Study. HIV Med. 2007 Nov;8 (8) :511-9. PubMed PMID: 17944684.

**Rosen CA**, Sodroski JG, Haseltine WA. 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. Cell 41(3):813-823.

**Rowley M**. The discovery of raltegravir, an integrase inhibitor for the treatment of HIV infection. Prog Med Chem. 2008;46:1-28. Review. PubMed PMID: 18381123.

**Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12):5463-5467.

**Selige J**, 2002. Etablierung und Vergleich generischer PCR-Systeme zum Nachweis der verschiedenen Gruppen und Subtypen der humanen Immundefizienzviren vom Typ 1. Fachhochschule Giessen – Friedberg, Juni 2002 Diplomarbeit

**Sichtig N**, Sierra S, Kaiser R, Däumer M, Reuter S, Schülter E, Altmann A, Fätkenheuer G, Dittmer U, Pfister H, Esser S. Evolution of raltegravir resistance during therapy. J Antimicrob Chemother. 2009 Jul;64(1):25-32. Epub 2009 May 14. PubMed PMID: 19447792.

**Stebbing J**, Gazzard B, Douek DC. 2004. Where does HIV live? The New England journal of medicine 350(18):1872-1880.

**Wan M**, Takagi M, Loh BN, Xu XZ, Imanaka T. 1996. Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease. The Biochemical journal 316 ( Pt 2):569-573.

**Wilson JW**. 2003. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. The AIDS reader 13(1):25-30, 35-28.

**Wong JK**, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. Science (New York, NY 278(5341):1291-1295.

**Yahi N**, Fantini J, Henry M, Tourres C, Tamalet C. 2005. Structural analysis of reverse transcriptase mutations at codon 215 explains the predominance of T215Y over T215F in HIV-1 variants selected under antiretroviral therapy. Journal of biomedical science 12(5):701-710.

# 7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| Acc. No. | accession number (Zugangsnummer) |
| AIDS | *acquired immunodeficiency syndrome* (erworbenes Immundefektsyndrom) |
| ART | *anti-retroviral therapy* (antiretrovirale Therapie) |
| as | antisense |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMG | Bundesministerium für Gesundheit |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| CA | Capsidprotein (p24) |
| ca. | zirca |
| cART | *combined anti-retroviral therapy* |
| CCR5 | CC-Chemokinrezeptor 5 |
| CD | *cluster of differentiation* |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| cDNA | *complementary* DNA (komplementäre DNA) |
| CPE | Zytopathischer Effekt |
| CRF | *circulating recombinant form* |
| ct | *cycles* (Anzahl PCR-Zyklen) |
| CXCR4 | CXC-Chemokinrezeptor 4 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EI | Eintritts-Inhibitor |
| ELISA | *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* |
| EMBL | *European Molecular Biology Laboratory* |
| *env* | *envelope* |
| *et al.* | *et alii* |
| EVG | Elvitegravir |
| FKS | fötales Kälberserum |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| *gag* | *group-specific antigen* |
| gp | Glykoprotein |
| HAART | *highly active anti-retroviral therapy* (hochaktive antiretrovirale Therapie) |
| HIV | *Human Immunodeficiency Virus* (Humanes Immundefizienz Virus) |
| HPL | Hochprävalenzländer (Transmissionsgruppe) |
| IN | Integrase |
| INI | Integrase-Inhibitoren |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid |
| IVDA | *intravenöser Drogenanwender* (Transmissionsgruppe) |
| kB | Kilobasen |

| | |
|---|---|
| kD | Kilodalton |
| LB | *Luria Bertani* |
| LI | Link-Protein (p6) |
| LTR | *long terminal repeat* |
| MA | Matrixprotein (p17) |
| mRNA | *messenger RNA* (Boten-RNA) |
| MSM | Männer, die Sex mit Männern haben (Transmissionsgruppe) |
| MW | Mittelwert |
| NC | Nukleocapsidprotein (p7) |
| *Nef* | *negative factor* |
| NNRTI | Nicht-Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| NRTI | Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| nt | Nukleotid |
| ORF | *open reading frame* (offener Leserahmen) |
| p | Protein |
| PBS | *phosphate buffered saline* (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | *polymerase chain reaktion* (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PI | Proteaseinhibitor |
| *pol* | *polymerase* |
| PR | Protease |
| qeq | Genomäquivalent |
| RAL | Raltegravir |
| *Rev* | *regulator of expression* |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNaseH | RibonukleaseH |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SIV | Simianes Immundefizienz Virus |
| STABW | Standardabweichung |
| SU | externes Glykoprotein (gp120) |
| T | Thymin |
| TAE | Tris/Acetat/EDTA |
| TAM | Thymidinanaloga-Resistenzmutation |
| *Tat* | *transactivator of transcription* |
| TBS | *tris buffered saline* (trisgepufferte Kochsalzlösung) |
| TM | transmembranes Glykoprotein (gp41) |
| tRNA | *transfer* RNA (Träger-RNA) |
| UNAIDS | *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* |
| V | Volt |
| *Vif* | *virion infectivity factor* |
| *Vpr* | *viral protein R* |
| *Vpu* | *viral protein U* |

# 8 Erklärung

Name: Stefan Fiedler Matrikel-Nr.: 36949

Ich erkläre, dass ich diese Bachelorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 30.01.2010 . . . . . .

(Unterschrift)

# 9 Appendix

**Tab.16 Ergebnisse Verdünnungsreihen NL4.3**

| PCR | letzte Bande bei geq/ml | erste nicht sichtbare Bande bei geq/ml |
|---|---|---|
| 1 | 650 | 65 |
| 2 | 65 | 6 |
| 3 | 650 | 65 |
| 4 | 650 | 65 |
| 5 | 260 | 65 |
| 6 | 650 | 65 |
| 7 | 650 | 65 |
| 8 | 650 | 65 |
| 9 | 650 | 65 |
| 10 | 650 | 65 |
| 11 | 260 | 215 |
| 12 | 6500 | 650 |
| 13 | 80 | 27 |
| 14 | 80 | 27 |
| MW Gesamt | 457 | |
| StabW | 260 | |

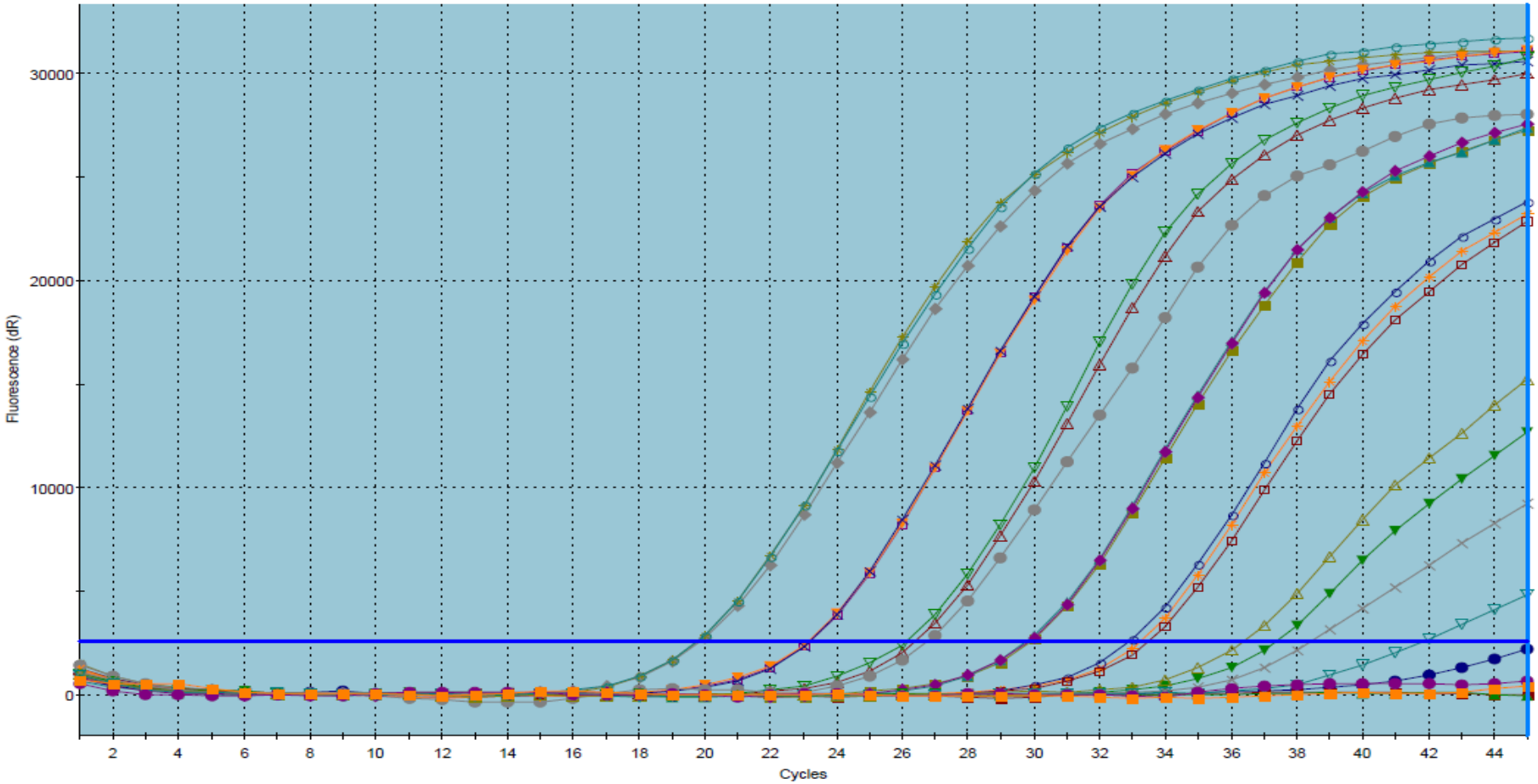


**Abb.16 Beispiel Auswertung LTR-RT-PCR**

Dargestellt: Verdünnungsreihe des Konzentrationsstandard NL4.3, je drei Messreihen für eine Verdünnungsstufe, blaue Linie *treshold*, drei ct Unterschied entsprechen einer log-Stufe, Streuung der Messreihen beginnt ab 650 geq/ml, die letzten Verdünnungsstufen lagen unter dem *treshold*

## Tab.17 Übersicht Subtypenpanel, Genomregion, Protokolldaten

| Sub-typ | Lab.Nr. | Isolate von | Isolat-bezeichnung | DNA-env C2V5 | Sequenz gag p17 | subtyp 5'LTR | RNA-Seq. env C2V5 | *Int* sub-typ | subtyp gag p17 | Extrahiert: | PCR: | Überstand von Tag | Sequenz: | LTR-RT-PCR geq/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | **2** | WHO | 92UG029 | | A | A | A | A1 | | 13.07.09 | 14.07.09 | 10 | 18.07.09 | 2,57E+09 |
| **A** | **6** | WHO | 92RW009 | A | C, C | C | A | A2 | | 24.06.09 | 24.06.09 | 13 | 29.06.09 | 8,62E+08 |
| **AE** | **3** | WHO | 92TH022 | AE | | AE | E | 01_AE | | 30.06.09 | 30.06.09 | 20 | 04.07.09 | 2,01E+07 |
| **AE** | **26** | WHO_Charité/PEI | 92TH009 | | | | | 01_AE | | 30.06.09 | 30.06.09 | 12 | 04.07.09 | 2,03E+08 |
| **AG** | **33** | Nigeria/RKI-Isolat | 00200 | AG | AG | | AG | 02_AG | AG | 13.07.09 | 14.07.09 | 17 | 18.07.09 | 3,13E+04 |
| **B** | **4** | WHO | 92TH026 | B | | B | B | B | | 13.07.09 | 14.07.09 | 13 | 18.07.09 | 1,12E+09 |
| **B** | **22** | MvP | 6960/95 | B | B | B | | B | | 24.06.09 | 24.06.09 | 22 | 29.06.09 | 3,05E+08 |
| **C** | **7** | WHO | 92BR025 | C | C | C | C | C | | 24.06.09 | 24.06.09 | 13 | 29.06.09 | 1,97E+09 |
| **C** | **15** | MvP | 484/97 | C | C | C | C | C | | 24.06.09 | 24.06.09 | 10 | 29.06.09 | 1,65E+09 |
| **D** | **1** | WHO | 92UG021 | D | D | D | D | D | | 24.06.09 | 24.06.09 | 10 | 29.06.09 | 8,45E+09 |
| **D** | **30** | WHO_Charité/PEI | 92UG035 | | | | | A1 | | 30.06.09 | 30.06.09 | 12 | 04.07.09 | 4,36E+07 |
| **F** | **9** | WHO | 93BR020 | F | F | F | F | F1 | | 30.06.09 | 30.06.09 | 13 | 04.07.09 | 1,56E+09 |
| **F** | **10** | WHO | 93BR029 | F | | | F | B | | 30.06.09 | 30.06.09 | 13 | 04.07.09 | 3,79E+09 |
| **G** | **12** | MvP | 82006/96 ARP/173 | G | G | G | G | G | | 30.06.09 | 30.06.09 | 10 | 04.07.09 | 3,06E+07 |
| **G** | **27** | WHO_Charité/PEI | RU570 | | | | | G | | 30.06.09 | 30.06.09 | 12 | 04.07.09 | 3,28E+09 |
| **H** | **28** | WHO_Charité/PEI | HIV V1557 | | | | | H | | 30.06.09 | 30.06.09 | 12 | 04.07.09 | 7,94E+08 |

## Tab.18 Polymorphismen und resistenz-assoziierte Mutationen des Patienten-panels (>10%) Teil 1: Position 10-113

| Risikogruppe | Inf.Jahr | Subtyp | sCount | Aminosäureposition der Integrase | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 10 | 11 | 14 | 17 | 21 | 31 | 32 | 50 | 72 | 101 | 112 | 113 |
| B, Hetero | 2000 | B | 01-00269 | | E11D | | | | V31I | | | | L101I | | |
| B, Hetero | 2002 | B | 02-00086 | | E11D | | | | | | | I72V | L101I | T112I | |
| B, Hetero | 2004 | B | 04-00018 | | | | | | | | | I72V | | | |
| B, Hetero | 2004 | B | 04-00542 | E10D | E11D | | | A21T | | | M50I | I72V | | T112I | |
| B, Hetero | 2004 | B | 05-00123 | | E11D | | | | | V32I | | I72V | | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00084 | | | K14R | | | | | | I72V | | | I113V |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00310 | E10D | | | | | V31I | V32I | | I72V | | | I113V |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00339 | | | | | | | | | | | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00513 | | | | | A21S | | V32I | | I72V | L101I | | |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00536 | | | | | | | | | | | | I113V |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00672 | | | | S17N | | | | M50I | I72V | | | |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00793 | E10D | | | | | | | M50I | I72V | | | |
| B, IVDA | 2002 | B | 02-00641 | E10D | | | | | | | | | | T112A | |
| B, IVDA* | 2003 | B | 03-00336 | | | | | | | | | | | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00384 | E10D | | | | | | | | | | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00540 | | | | S17N | | | | | I72V | | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00653 | | | | | | | | | | | | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-00104 | E10D | E11D | | | A21T | | | M50I | | | | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-00938 | E10D | E11D | | | A21T | | | M50I | I72V | | T112I | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-01173 | | E11D | K14KR | | A21T | | | | I72V | | | |
| B, MSM | 2000 | B | 03-00049 | | E11D | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2000 | B | 03-00140 | | | | | | | | | | L101I | | |
| B, MSM | 2002 | B | 02-00695 | | | | | | | | | | | T112V | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00053 | | | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00148 | | E11D | | | | V31I | V32I | M50I | | | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00193 | E10D | | K14R | | | | | | I72V | L101I | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00233 | | | | S17N | | | | | | L101I | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00248 | | | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00255 | | | | | | V31I | | | | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00290 | | | | S17N | | | | | I72V | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00496 | | | | | | | | | | | T112I | I113V |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00518 | | | | | | | | | | | | I113V |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00670 | | E11D | | | | V31I | | | | L101I | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00492 | | | | | | | | | | L101I | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00516 | | | | S17N | | | | | I72V | | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00638 | E10V | | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00764 | | | | | | V31IMV | | | | L101I | | |
| nonB, HPL, He** | 2004 | CRF02_ | 04-00497 | | | K14R | | | V31I | | M50T | I72V | L101I | T112V | |
| nonB, HPL, He | 2005 | CRF01_ | 05-01160 | | | K14R | | A21T | V31I | | | I72V | | T112V | |
| nonB, HPL, He | 2005 | CRF02_ | 06-00006 | | | K14R | | | | V32I | | | L101I | T112V | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF01_ | 06-00368 | | E11D | | | A21T | V31I | | | I72V | | T112V | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF01_ | 06-00524 | | | K14R | | A21T | V31I | | | I72V | L101V | T112V | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF02_ | 07-00138 | | | K14R | | | V31I | | | I72V | L101I | T112I | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prozentualer Anteil n=38: | | | | 21,4 | 21,4 | 19,0 | 11,9 | 19,0 | 23,8 | 11,9 | 16,7 | 45,2 | 26,2 | 26,2 | 11,9 |
| >10% | | | | 21,4 | 21,4 | 19,0 | 11,9 | 19,0 | 23,8 | 11,9 | 16,7 | 45,2 | 26,2 | 26,2 | 11,9 |

* Isolat PCR negativ
** 6 Isolate non-B, HPL

## Tab.19 Polymorphismen und Resistenzassoziierte Mutationen Patientenpanel >10% Teil 2

| Risikogruppe | Inf.Jahr | Subtyp | sCount | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 119 | 122 | 124 | 125 | 126 | 134 | 135 | 136 | 154 | 193 | 201 | 234 | 256 |
| B, Hetero | 2000 | B | 01-00269 | S119R | | | | | | | | | G193E | | | D256E |
| B, Hetero | 2002 | B | 02-00086 | S119R | | T124N | T125A | | | I135V | | | | V201I | L234V | |
| B, Hetero | 2004 | B | 04-00018 | | | T124N | T125V | V126L | | | | | | | | D256E |
| B, Hetero | 2004 | B | 04-00542 | | | | T125V | | | | | | | V201I | | |
| B, Hetero | 2004 | B | 05-00123 | | | | | | | | | | | V201I | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00084 | | | T124A | | | | | | | | V201I | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00310 | | | | | | | | | | | V201I | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00339 | | T122I | T124A | | | | | | **M154I** | | | | |
| B, Hetero | 2005 | B | 05-00513 | S119P | T122I | | | | | | | | | | | |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00536 | | | | T125AT | | | | | | | | L234I | |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00672 | | | T124N | T125V | V126L | | I135V | | | | | | D256E |
| B, Hetero | 2006 | B | 06-00793 | S119P | T122I | | | | | | | | G193E( | V201IV | | D256E |
| B, IVDA | 2002 | B | 02-00641 | S119G | T122I | T124A | T125A | | | | | | | V201I | | |
| B, IVDA | 2003 | B | 03-00336 | | | | | | | | | | | | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00384 | | | T124N | | | | | | **M154I** | | V201I | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00540 | | | | | | | | | **M154I** | | V201I | | |
| B, IVDA | 2004 | B | 04-00653 | | T122I | T124A | | | | | | **M154I** | | | | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-00104 | S119RS | | | | | | | | | | V201I | | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-00938 | | | | T125V | | | | | **M154I** | | V201I | | |
| B, IVDA | 2005 | B | 05-01173 | | | | | | | | | | | | L234V | D256E |
| B, MSM | 2000 | B | 03-00049 | | | T124A | | | | | | | G193E | | | |
| B, MSM | 2000 | B | 03-00140 | | | T124N | T125A | | | | | | | | L234I | D256E |
| B, MSM | 2002 | B | 02-00695 | | T122I | T124N | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00053 | | | | | | | | | | | V201I | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00148 | | | | | | | | | | G193E | V201I | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00193 | S119P | T122I | T124A | | | | | | | | V201I | | |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00233 | | | T124A | | | | | | | | V201I | | D256E |
| B, MSM | 2003 | B | 03-00248 | | | T124A | | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00255 | S119P | | | T125A | V126M | | | | | | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00290 | | | T124A | T125A | V126L | | | | | | | | D256E |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00496 | S119T | | T124N | T125V | | | | | | | | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00518 | | | T124A | | | | | | | | V201I | | |
| B, MSM | 2004 | B | 04-00670 | S119R | | T124N | | | | I135V | | | | | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00492 | S119T | | T124Q | T125M | | | | | | G193E | | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00516 | S119P | | T124N | T125A | | | | | | | V201I | | |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00638 | S119P | T122I | T124N | T125A | | | I135V | | | | | | D256E |
| B, MSM | 2005 | B | 05-00764 | | | | | | | | | | G193R | | | |
| nonB, HPL, He | 2004 | CRF02_ | 04-00497 | S119P | T122I | T124A | T125A | | G134N | I135V | K136T | | | V201I | L234I | |
| nonB, HPL, He | 2005 | CRF01_ | 05-01160 | | | T124A | T125A | V126L | G134N | I135V | K136R | | | V201I | L234I | |
| nonB, HPL, He | 2005 | CRF02_ | 06-00006 | | | T124A | T125A | | G134D | I135V | K136T | | | V201I | L234I | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF01_ | 06-00368 | | | T124A | T125A | | G134N | I135V | K136R | | | V201I | L234I | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF01_ | 06-00524 | | | T124A | T125A | | G134N | I135V | K136R | | | V201I | L234I | |
| nonB, HPL, He | 2006 | CRF02_ | 07-00138 | | | T124A | T125A | | G134N | I135V | K136T | | | V201I | L234I | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prozentualer Anteil n=38: | | | | 28,6 | 21,4 | 61,9 | 45,2 | 11,9 | 14,3 | 21,4 | 14,3 | **11,9** | 11,9 | 52,4 | 21,4 | 19,0 |
| >10% | | | | 28,6 | 21,4 | 61,9 | 45,2 | 11,9 | 14,3 | 21,4 | 14,3 | **11,9** | 11,9 | 52,4 | 21,4 | 19,0 |

## Tab.20 Referenzdaten*

| Name | Acc. No. | Land | Name | Acc. No. | Land |
|---|---|---|---|---|---|
| A1.GE.99.99GEMZ011 | DQ207944 | Georgia | H.BE.93.VI991 | AF190127 | Belgium |
| A1.KE.00.KER2008 | AF457052 | Kenya | H.BE.93.VI997 | AF190128 | Belgium |
| A1.KE.00.KNH1144 | AF457066 | Kenya | H.CF.90.056 | AF005496 | C.A.R. |
| A1.KE.00.KSM4024 | AF457077 | Kenya | J.CD.97.J_97DC_KTB147 | EF614151 | D.R.C. |
| A1.KE.00.MSA4069 | AF457080 | Kenya | J.SE.93.SE7887 | AF082394 | Sweden |
| A1.KE.00.NKU3005 | AF457089 | Kenya | K.CD.97.EQTB11C | AJ249235 | D.R.C. |
| A1.RU.00.RU00051 | EF545108 | Russia | K.CM.96.MP535 | AJ249239 | Cameroon |
| A1.RW.93.93RW_024 | AY713406 | Rwanda | 01_AE.CF.90.90CF11697 | AF197340 | C.A.R. |
| A1.SE.95.SE8891 | AF069673 | Sweden | 01_AE.CN.05.FJ051 | DQ859178 | China |
| A1.SE.95.UGSE8131 | AF107771 | Sweden | 01_AE.CN.06.FJ054 | DQ859180 | China |
| A1.TZ.01.A173 | AY253305 | Tanzania | 01_AE.HK.x.HK001 | DQ234790 | Hong Kong |
| A1.UA.01.01UADN139 | DQ823357 | Ukraine | 01_AE.TH.01.01TH_R2184 | AY945730 | Thailand |
| A1.UG.92.92UG037 | AB253429 | Uganda | 01_AE.TH.02.OUR769I | AY358062 | Thailand |
| A1.UG.99.99UGA07072 | AF484478 | Uganda | 01_AE.TH.90.CM240 | U54771 | Thailand |
| A2.CD.97.97CDKTB48 | AF286238 | D.R.C. | 01_AE.US.00.00US_MSC1164 | AY444804 | USA |
| A2.CY.94.94CY017_41 | AF286237 | Cyprus | 02_AG.CM.02.02CM_4082STN | AY371141 | Cameroon |
| A.SN.01.DDI579 | AY521629 | Senegal | 02_AG.EC.x.ECU41 | AY151001 | Ecuador |
| A.SN.01.DDJ369 | AY521631 | Senegal | 02_AG.GH.03.GHNJ196 | AB231898 | Ghana |
| A.SN.96.DDJ360 | AY521630 | Senegal | 02_AG.NG.01.PL0710 | DQ168577 | Nigeria |
| A.CD.02.02CD_KTB035 | AM000055 | D.R.C. | 02_AG.NG.x.IBNG | L39106 | Nigeria |
| A.CD.97.97CD_KCC2 | AM000053 | D.R.C. | 02_AG.SE.94.SE7812 | AF107770 | Sweden |
| A.CD.97.97CD_KTB13 | AM000054 | D.R.C. | 02_AG.SN.98.MP1211 | AJ251056 | Senegal |
| B.AR.04.04AR151516 | DQ383752 | Argentina | 03_AB.RU.97.KAL153_2 | AF193276 | Russia |
| B.AU.87.MBC925 | AF042101 | Australia | 04_cpx.CY.94.CY032 | AF049337 | Cyprus |
| B.BO.99.BOL0122 | AY037270 | Bolivia | 05_DF.BE.x.VI1310 | AF193253 | Belgium |
| B.BR.03.BREPM2012 | EF637046 | Brazil | 06_cpx.AU.96.BFP90 | AF064699 | Australia |
| B.CA.97.CANB3FULL | AY779553 | Canada | 08_BC.CN.97.97CNGX_6F | AY008715 | China |
| B.CN.05.05CNHB_hp3 | DQ990880 | China | 09_cpx.GH.96.96GH2911 | AY093605 | Ghana |
| B.CO.01.PCM001 | AY561236 | Colombia | 10_CD.TZ.96.96TZ_BF061 | AF289548 | Tanzania |
| B.GB.83.CAM1 | D10112 | USA | 11_cpx.GR.x.GR17 | AF179368 | Greece |
| B.GB.86.GB8 | AJ271445 | USA | 12_BF.AR.99.ARMA159 | AF385936 | Argentina |
| B.GE.03.03GEMZ010 | DQ207942 | Georgia | 13_cpx.CM.96.1849 | AF460972 | Cameroon |
| B.IT.05.SG1 | DQ672623 | Italy | 14_BG.DE.01.9196_01 | AY882421 | Germany |
| B.JP.05.DR6538 | AB287363 | Japan | 15_01B.TH.99.99TH_MU2079 | AF516184 | Thailand |
| B.KR.05.05CSR3 | DQ837381 | S. Korea | 16_A2D.KR.97.97KR004 | AF286239 | S. Korea |
| B.NL.00.671_00T36 | AY423387 | Netherlands | 17_BF.PE.02.PE02_PCR0155 | EU581828 | Peru |
| B.RU.04.04RU128005 | AY682547 | Russia | 18_cpx.CU.99.CU76 | AY586540 | Cuba |
| B.TH.00.00TH_C3198 | AY945710 | Thailand | 19_cpx.CU.99.CU7 | AY894994 | Cuba |
| B.UA.01.01UAKV167 | DQ823362 | Ukraine | 20_BG.CU.99.Cu103 | AY586545 | Cuba |
| B.US.04.ES10_53 | EF363127 | United | 21_A2D.KE.91.KNH1254 | AY945737 | Kenya |
| B.US.99.PRB959_03 | AY331296 | United | 22_01A1.CM.01.01CM_0001BBY | AY371159 | Cameroon |
| C.AR.01.ARG4006 | AY563170 | Argentina | 23_BG.CU.03.CB118 | AY900571 | Cuba |
| C.BR.04.04BR013 | AY727522 | Brazil | 24_BG.CU.03.CB378 | AY900574 | Cuba |
| C.BW.00.00BW07621 | AF443088 | Botswana | 24_BG.CU.03.CB471 | AY900575 | Cuba |
| C.CN.98.YNRL9840 | AY967806 | China | 25_cpx.CM.01.101BA | DQ826726 | Cameroon |
| C.ET.02.02ET_288 | AY713417 | Ethiopia | 27_cpx.CD.97.97CDKTB49 | AJ404325 | D.R.C. |
| C.GE.03.03GEMZ033 | DQ207941 | Georgia | 28_BF.BR.99.BREPM12609 | DQ085873 | Brazil |
| C.IL.99.99ET7 | AY255824 | Israel | 29_BF.BR.02.BREPM119 | AY771590 | Brazil |
| C.IN.99.01IN565_10 | AY049708 | India | 31_BC.BR.02.110PA | EF091932 | Brazil |
| C.KE.00.KER2010 | AF457054 | Kenya | 32_06A1.EE.01.EE0369 | AY535660 | Estonia |
| C.MM.99.mIDU101_3 | AB097871 | Myanmar | 33_01B.MY.05.05MYKL007_1 | DQ366659 | Malaysia |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| C.MW.93.93MW_965 | AY713413 | Malawi | 34_01B.TH.99.OUR2478P | EF165541 | Thailand |
| C.SN.90.90SE_364 | AY713416 | Senegal | 35_AD.AF.05.05AF095 | EF158041 | Afghanistan |
| C.SO.89.89SM_145 | AY713415 | Somalia | 36_cpx.CM.00.00CMNYU830 | EF087994 | Cameroon |
| C.TZ.02.CO178 | AY734556 | Tanzania | 37_cpx.CM.00.00CMNYU926 | EF116594 | Cameroon |
| C.UY.01.TRA3011 | AY563169 | Uruguay | 38_BF1.UY.05.UY05_4752 | FJ213780 | Uruguay |
| C.YE.02.02YE511 | AY795906 | Yemen | 39_BF.BR.03.03BRRJ103 | EU735534 | Brazil |
| C.ZA.04.04ZASK164B1 | DQ056405 | S. Korea | 40_BF.BR.04.04BRRJ115 | EU735538 | Brazil |
| C.ZA.05.05ZAPSK240B1 | DQ369991 | S. Korea | 42_BF.LU.03.luBF_05_03 | EU170155 | Luxembourg |
| C.ZM.02.02ZM108 | AB254141 | Zambia | 43_02G.SA.03.J11223 | EU697904 | Saudi Arabia |
| D.CD.83.ELI | K03454 | D.R.C. | U.CD.83.83CD003 | AF286236 | D.R.C. |
| D.CM.01.01CM_0009BBY | AY371155 | Cameroon | U.CD.90.90CD121E12 | AF457101 | D.R.C. |
| D.KE.01.NKU3006 | AF457090 | Kenya | U.GR.99.GR303 | AY046058 | Greece |
| D.KR.04.04KBH8 | DQ054367 | S. Korea | CPZ.CM.01.SIVcpzCAM13 | AY169968 | Cameroon |
| D.TD.99.MN011 | AJ488926 | Chad | CPZ.CM.05.SIVcpzEK505 | DQ373065 | Cameroon |
| D.TZ.01.A280 | AY253311 | Tanzania | CPZ.CM.05.SIVcpzLB7 | DQ373064 | Cameroon |
| D.UG.99.99UGK09259 | AF484498 | Uganda | CPZ.CM.05.SIVcpzMB66 | DQ373063 | Cameroon |
| D.YE.01.01YE386 | AY795903 | Yemen | CPZ.CM.05.SIVcpzMT145 | DQ373066 | Cameroon |
| D.YE.02.02YE516 | AY795907 | Yemen | CPZ.GA.88.GAB1 | X52154 | Gabon |
| D.ZA.90.R1 | EF633445 | S. Korea | CPZ.TZ.00.TAN1 | AF447763 | Tanzania |
| F1.AR.02.ARE933 | DQ189088 | Argentina | CPZ.US.85.CPZUS | AF103818 | USA |
| F1.BE.93.VI850 | AF077336 | Belgium | CPZ.CM.x.SIVcpzDP943 | EF535993 | Cameroon |
| F1.BR.01.01BR125 | DQ358802 | Brazil | CPZ.CM.x.SIVcpzMB897 | EF535994 | Cameroon |
| F1.ES.x.P1146 | DQ979023 | Spain | N.CM.02.DJO0131 | AY532635 | Cameroon |
| F1.FI.93.FIN9363 | AF075703 | Finland | N.CM.04.04CM_1015_04 | DQ017382 | Cameroon |
| F2.CM.02.02CM_0016BBY | AY371158 | Cameroon | N.CM.04.04CM_1131_03 | DQ017383 | Cameroon |
| F2.CM.95.MP257 | AJ249237 | Cameroon | N.CM.95.YBF30 | AJ006022 | Cameroon |
| F2.CM.97.CM53657 | AF377956 | Cameroon | N.CM.97.YBF106 | AJ271370 | Cameroon |
| G.BE.96.DRCBL | AF084936 | Belgium | O.BE.87.ANT70 | L20587 | Belgium |
| G.CM.01.01CM_4049HAN | AY371121 | Cameroon | O.CM.91.MVP5180 | L20571 | Cameroon |
| G.CU.99.Cu74 | AY586547 | Cuba | O.CM.96.96CMABB637 | AY169810 | Cameroon |
| G.ES.99.X138 | AF450098 | Spain | O.CM.98.98CMA104 | AY169802 | Cameroon |
| G.GH.03.03GH175G | AB287004 | Ghana | O.CM.99.99CMU4122 | AY169815 | Cameroon |
| G.KE.93.HH8793_12_1 | AF061641 | Kenya | O.FR.92.VAU | AF407418 | France |
| G.NG.01.01NGPL0669 | DQ168576 | Nigeria | O.SN.99.SEMP1299 | AJ302646 | Senegal |
| G.PT.x.PT2695 | AY612637 | Portugal | O.US.99.99USTWLA | AY169814 | USA |
| G.SE.93.SE6165 | AF061642 | Sweden | | | |

* HIV Sequenz Compendium 2005 Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors J, Wolinsky S, and Korber B, Eds. Published by Theoretical Biology and Biophysiks Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 06-0680
(www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html)

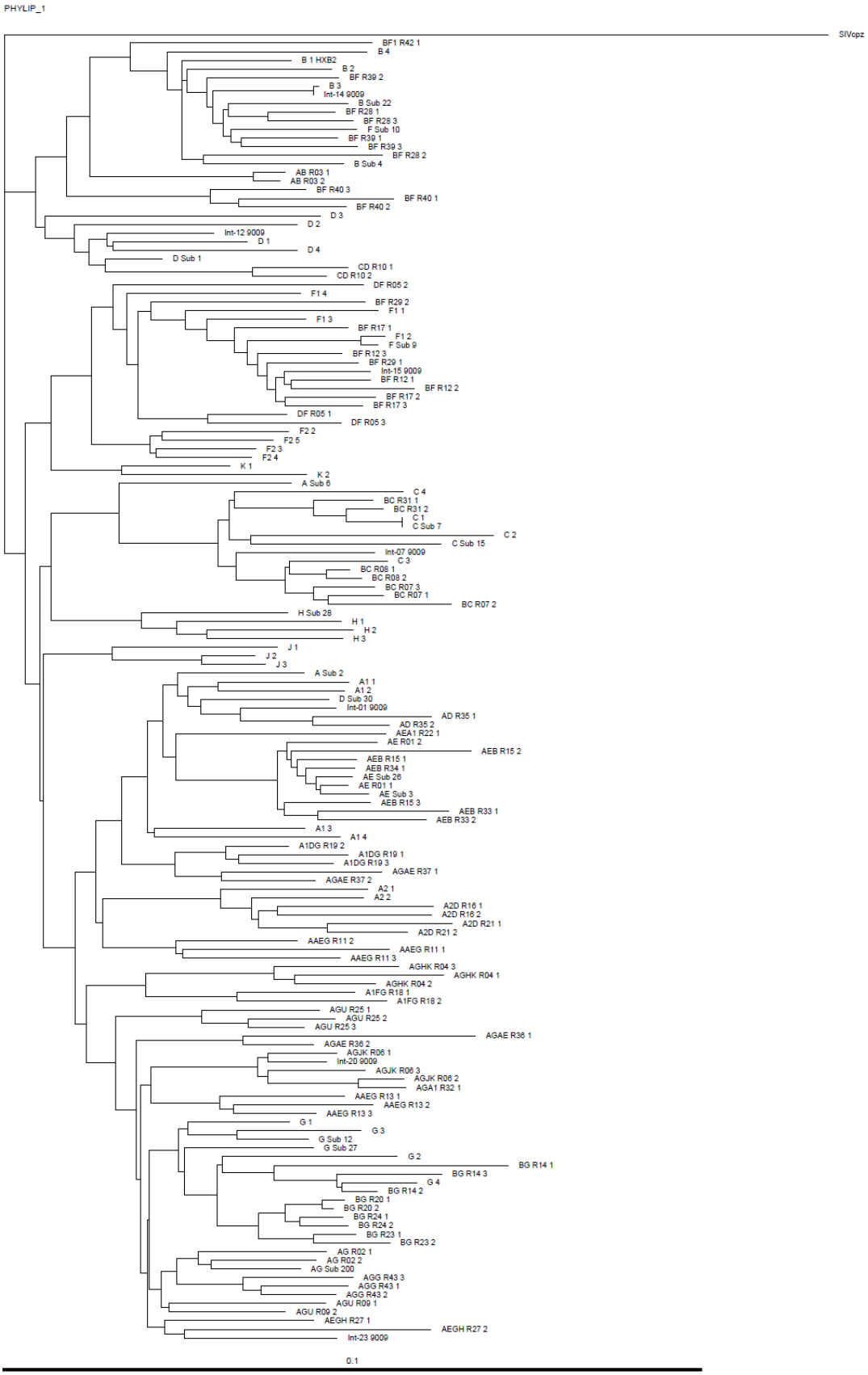


**Abb.17 Subtypbestimmung der *int*-Sequenzen des Ringversuchpanels**

Alignment mit 7 Patientensequenzen und 145 Subtypenreferenzsequenzen

# 10 Danksagung

In erster Linie möchte ich Dr. Claudia Kücherer und Dr. Stephan Loschen für die Bereitstellung meines Themas und ihre intensive Betreuung danken. Sie haben sich immer Zeit für mich genommen und mit zahlreichen Diskussionen, Ideen und Korrekturen wesentlich zum Gelingen meiner Bachelorarbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe P11 bedanken. Neben dem nötigen Spaß bei der Arbeit haben mich alle Mitarbeiter und Hospitanten durch ihre enorme Hilfsbereitschaft unterstützt.

Ganz besonderen dank gilt Prof. Annett Fuchs, für die vielen anspruchsvollen und interessanten Vorlesungen und Praktika, welche als Vorbereitung auf das Arbeitsleben dienten.