

**Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München,
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. Ulrich Koszinowski**

Mutationen in der Connection und RNase H-Domain der Reversen Transkriptase von HIV-1

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Vorgelegt von

Nicola Schönewolf

aus Hamburg

2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Johannes Bogner,
Privatdozent Dr. Aloys Schepers

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2010

Inhalt

1	Einleitung	5
2	Grundlagen	6
2.1	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	6
2.1.1	Historie, Epidemiologie, Klassifikation	7
2.1.2	Aufbau	8
2.1.3	Übertragung und Infektionswege	8
2.2	Reverse Transkriptase	10
2.2.1	Funktion und Struktur	10
2.2.2	Dynamik	11
2.3	Therapie	12
2.3.1	Therapeutika	12
2.3.2	Resistenzmechanismen	15
2.3.3	Highly Activated Antiretroviral Therapy (HAART)	16
3	Motivation	18
3.1	Aktuelle Arbeiten	18
3.1.1	RNase H-Funktion und -Inhibition	18
3.1.2	Einfluss von Mutationen auf die Funktion von RNase H bzw. Reverser Transkriptase	18
3.1.3	Auswirkungen von Mutationen auf Resistenzmechanismen	19
3.2	Fragestellung der Arbeit	20
4	Experimente	21
4.1	Material	21
4.1.1	Geräte	21
4.1.2	Zubehör	21
4.1.3	Reagenzien	22
4.1.4	Software	23
4.1.5	Patientenmaterial	24
4.1.6	Referenzsequenz	24
4.2	Methoden	26
4.2.1	Primer und ihr Design	26
4.2.2	Primer Design	26
4.2.3	Extraktion	28
4.2.4	Reverse Transkription	29
4.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
4.2.6	Gelelektrophorese	36
4.2.7	Sequenzierung	37
4.2.8	Auswertung	39

5	Ergebnisse und Interpretation	40
5.1	Subtyp B	40
5.1.1	Schlüsselpositionen in Connection und RNase H-Domain	40
5.1.2	Weitere funktionell relevante Positionen	40
5.2	Subtyp A	43
5.3	Subtypenspezifika	43
5.4	Subtyp Non-A-Non-B	43
6	Diskussion	44
6.1	Auftreten von Mutationen	44
6.1.1	Positionen mit hoher Konservierung	44
6.1.2	Positionen im Primer Grip	45
6.1.3	Wirkung auf die Enzymfunktion	45
6.1.4	Spezifizierung nach Subtypen	46
6.2	Therapeutischer Einfluss auf potentielle Mutationen	48
6.2.1	Position 333	48
6.2.2	Position 359	49
6.2.3	Position 371	49
6.2.4	Position 390	49
6.2.5	Position 558	50
6.2.6	Auswirkungen der Resistenzmutationsgruppen	50
6.3	Korrelation der aktiven Zentren	51
6.4	Schlussfolgerung und Ausblick	52
7	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	55
	Anhang	60
	A.1 PCR-Resultate, zwei Methoden	60
	A.2 Komplette RT-Sequenzen aller Patienten	63
	A.3 Aminosäurecode	99
	Danksagung	101
	Lebenslauf	103

1 Einleitung

Seit der Isolierung des HI-Virus 1983 sind mehr als 25 Jahre Therapieggeschichte vergangen. Drei große Medikamentengruppen werden zur Bekämpfung des Acquired Immune Deficiency Syndroms (AIDS) regelmäßig eingesetzt: die NRTIs (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors), die NNRTIs (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) und die Protease-Inhibitoren. Alle drei greifen an zwei essentiellen funktionellen Enzymen an: an der Polymerase-Einheit der Reversen Transkriptase und an der Protease.

Doch auch im Rahmen von seit mehreren Jahren praktizierten Kombinationstherapien ist eine vollständige Heilung der AIDS-Erkrankung und Elimination der HIV-Infektion bisher nicht möglich. HIV kann u.a. in langlebigen Gedächtniszellen persistieren, von denen neue Replikationswellen ausgehen können. Ein wesentlicher Grund für die Notwendigkeit beständiger Weiterentwicklungen in der Therapie ist die hohe Replikationsrate des Virus und die damit einhergehende hohe Mutationsfrequenz. Unter Therapie werden bestimmte Mutationen selektiert, was zu Resistenz führt.

Als mögliches medikamentöses Angriffsziel wird in den letzten Jahren besonders intensiv eine eigenständige und unabhängig von der Polymerase funktionierende Einheit der viralen Reversen Transkriptase erforscht: die RNase H-Domain als essentielles Enzym für die reverse Transkription (Schatz et al., 1989, 1990; Wohrl et al., 1990; Tisdale et al., 1991; Gopalakrishnan et al., 1992; Gotte et al., 1998; Sarafianos et al., 2001). Bis heute allerdings ist die Funktionskinetik dieses für die reverse Transkription essentiellen Enzyms noch nicht hinreichend gut verstanden.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Funktion der RNase H-Domain im Hinblick auf Resistenzmechanismen unter Therapie aufzuklären. Einbezogen werden soll dabei auch die Connection Domain, die den Verbindungsbereich zwischen Polymerase und RNase H darstellt. Dazu soll zunächst nach Mutationen in diesen Bereichen bei behandelten und unbehandelten Patienten gesucht werden. Besonderer Wert soll auf die Verwendung einer belastbaren Referenzsequenz gelegt werden. Die Ergebnisse sollen mit der Literatur verglichen sowie mit Mutationen in der Polymerase Domain korreliert werden. Ziel der Arbeit ist eine fundierte Aussage zu der Frage, ob die Connection und/oder RNase H-Mutationen in die herkömmlichen Resistenzanalysen eingeschlossen werden sollten.

2 Grundlagen

2.1 Human Immunodeficiency Virus (HIV)

2.1.1 Historie, Epidemiologie, Klassifikation

Zwei Jahre nach den ersten Berichten über vermehrtes Auftreten seltener Erkrankungen (u.a. Kaposi-Sarkom und Pneumocystis-Pneumonien), vorrangig in der homosexuellen Szene, wurde 1983 das HI-Virus, Typ 1, aus den T-Zellen betroffener Patienten isoliert und als Erreger für das Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) verantwortlich gemacht (Barré-Sinoussi et al., 1983). 2006 wurden für Deutschland 2611 Erstdiagnosen von HIV gemeldet, was einem prozentualen Anstieg von 4% gegenüber den Neudiagnosen des Vorjahres entspricht. Seit 2001 ist ein Anstieg an Neudiagnosen von 81% zu verzeichnen. Den Hauptinfektionsweg der zuletzt gemeldeten Neuinfektionen bildeten homosexuelle Kontakte zwischen Männern (RKI, 2006).

Den heute international anerkannten Namen Human Immunodeficiency Virus (HIV) erhielt das Virus im Jahr 1986. Im selben Jahr wurde ein antigendifferenzierender Stamm in Westafrika entdeckt, der im Unterschied zum weitaus häufiger vorkommenden HIV-1, HIV-2 getauft wurde. HIV-1 stammt von SIVcpz (Simian Immunodeficiency Virus) ab, nachgewiesen in Schimpansen, und HIV-2 von SIVsmm (Simian Immunodeficiency Virus), nachgewiesen bei Sooty Mangabeys. Sowohl HIV-2 als auch HIV-1 replizieren in T-Zellen. HIV-2 zeigt im menschlichen Organismus allerdings einen langsameren Krankheitsverlauf als HIV-1, endet jedoch ebenso letal wie eine Infektion durch HIV-1. In Deutschland bzw. Europa trifft man hauptsächlich auf HIV-1, weshalb die vorliegende Arbeit diesen Stamm fokussiert.

Die für die Infektion im Menschen relevante HIV-1-Gruppe wird in mittlerweile neun Subtypen (A, B, C, D, F, G, H, K) eingeteilt, die sich in bestimmten Sequenzbereichen voneinander unterscheiden. Global herrschen die Subtypen A und C vor, in Deutschland bzw. Europa dominiert Subtyp B. Darüber hinaus existieren Kombinationsformen, Mosaikviren, die durch die Kombination verschiedener Subtypen (z.B. AE, BG, BC, AG etc.) entstehen. Circulating recombinant forms (CRFs) werden anhand von Sequenzanalysen detektiert, die Unterschiede auf der Genebene (gag, pol, env) verschiedener Subtypen der Gruppe M aufweisen.

Das Virus gehört zur Familie der Retroviren und darunter der Gattung der Lentiviren an. Wie alle Retroviren besitzt es eine Reverse Transkriptase, welche in der Lage ist, die einzelsträngige Plusstrang-RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben.

2.1.2 Aufbau

Das behüllte Virus weist einen Durchmesser von 100 nm auf. Die Hüllmembran, der Wirtszelle entliehen, ummantelt das Capsid (siehe Abbildung 1). Dem Capsid zugewandt liegt an der inneren Hüllmembran das Matrixprotein (MA). 2000 Capsid-Proteine (CA) formen den Kern, welcher die zwei Kopien der einzelsträngigen Plusstrang-RNA umfasst. Das Nucleocapsidprotein (NC) bindet an die RNA und stabilisiert sie. Weiterhin im Capsid befinden sich die viralen Enzyme Protease (PR, p11), Integrase (IN, p32) und Reverse Transkriptase (RT). Das Glycoprotein 120 (SU) verbindet transmembranär via gp 41 (TM) das Innere des Virions mit den Zielrezeptoren, dem CD4 der T-Zellen sowie mit den Corezeptoren CCR5 bzw. CXCR4.

Die klassische Struktur des viralen Genoms lautet 5'LTR-gag-pol-env-LTR-3' (siehe Abbildung 2). Wie die meisten replikationskompetenten Retroviren, bedarf HIV-1 dreier Gene: Gruppen-Antigen (gag), Polymerase (pol) und Envelope (env). Die Long Terminal Repeats (LTRs) besitzen keine proteinkodierende Funktion. Als Anfang und Ende des Genoms stehen sie in Verbindung mit der Wirtszellen-DNA, nachdem das reife Virus-Partikel in die Wirtszelle integriert worden ist. Gag kodiert für das Nucleocapsid, also die das Genom enthaltende Innenstruktur. Env kodiert für die Oberflächenproteine, die Glykoproteine TM und SU. Pol kodiert für die Enzyme PR, IN und RT.

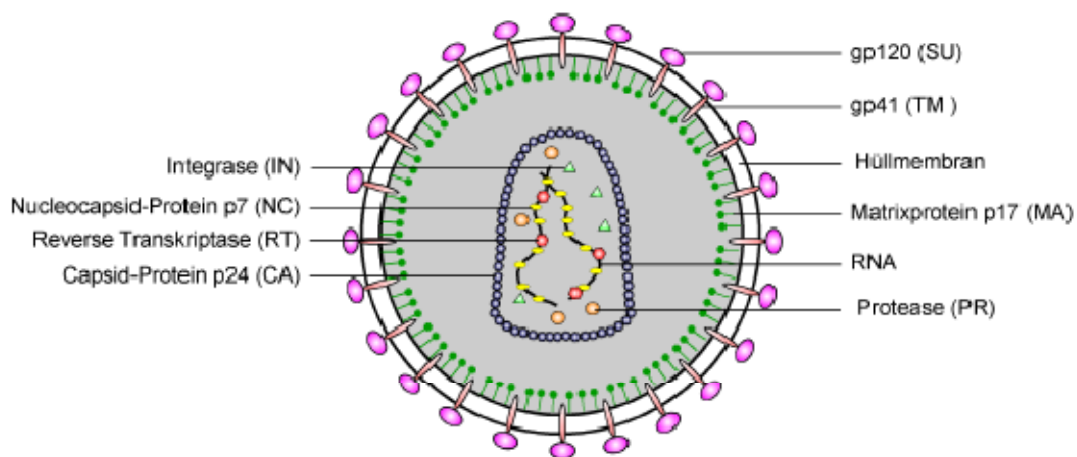


Abb. 1: Viruspartikel (Frankel et al., 1998)

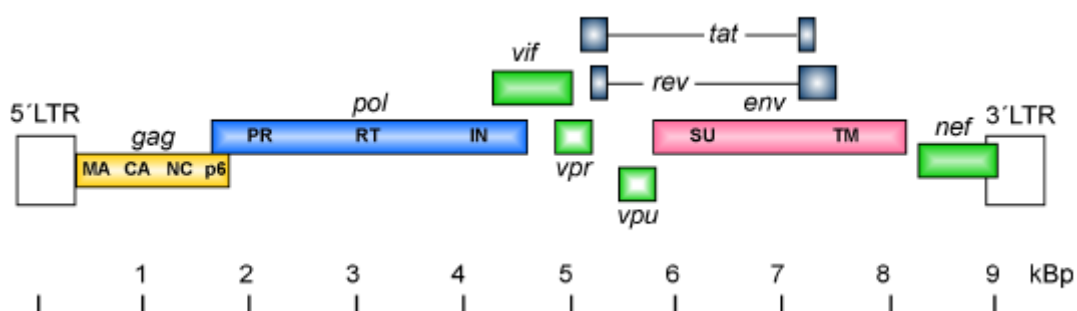


Abb. 2: Genomstruktur (Frankel et al., 1998)

Weitere sechs Gene vervollständigen die genetische Komplexität des Virus: Virion-Infektiositätsfaktor (vif), virionassoziiertes Protein R (vpr, essentiell für virale Replikation in Makrophagen), virales Protein U (vpu, wichtig für das Budding), die Regulatorproteine Transaktivator (tat) und Regulatorgen (rev, Übergang von der frühzeitigen Expression regulatorischer Proteine zur späteren Synthese der Strukturproteine) sowie Negative Replication Factor (nef, mit verschiedensten Funktionen, u.a. Downregulation der CD4 und HLA-I Moleküle von der Virus-Oberfläche für den Fluchtmechanismus des Virus). Nef, tat und rev werden frühzeitig im Replikationszyklus hergestellt.

2.1.3 Übertragung und Infektionswege

Folgende Übertragungswege des HIV-1 werden unterschieden: Ungeschützter Sexualverkehr mit infiziertem Partner, Injektion von infiziertem Blut oder Blutprodukten (Organtransplantationen und künstliche Befruchtung bieten einen potentiellen Infektionsweg), gemeinsame Nutzung von Injektionsbesteck mit infizierten Personen sowie Mutter-Kind-Übertragung (während der Schwangerschaft, perinatal oder via Muttermilch).

HIV bindet via gp120 an CD4-Rezeptoren sowie die Chemokin-Corezeptoren CCR5 bzw. CXCR4 an der Oberfläche der Zielzellen (siehe Abbildung 3). Diese sind vorwiegend T-Helferzellen, aber auch deren Vorläufer im Knochenmark und Thymus, Monozyten/Makrophagen, Eosinophile und dendritische Zellen (Langerhans in der Haut, Astrozyten und Mikroglia im ZNS) bieten via den CD4-positiven T-Zell-Rezeptor potentielle Angriffspunkte. Neben möglichen anderen humanen Zielzellen stellen T-Zellen, Monozyten und Makrophagen die am häufigsten befallene Gruppe.

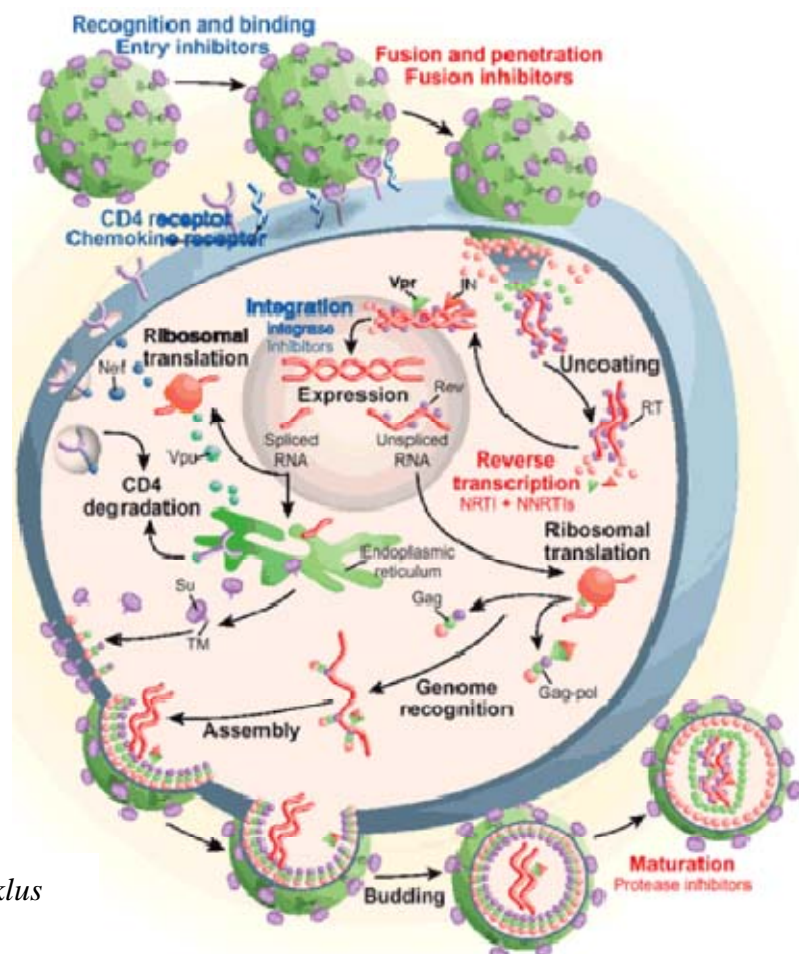


Abb. 3: Viraler Replikationszyklus (Pomerantz et al., 2003)

Die Fusion zwischen Virus und Zellmembran wird durch eine Konformationsänderung im gp41 ausgelöst, die auf die Bindung des gp120 an Rezeptor und Co-Rezeptor folgt. Sobald die Hüllmembran entfernt wird, gelangt die genomische RNA in Form eines Nukleoproteinkomplexes in das Zytoplasma der Wirtszelle. Hier findet die Reverse Transkription der einzelsträngigen viralen RNA in doppelsträngige cDNA statt. Die cDNA wird in den sogenannten Präintegrationskomplex, bestehend aus IN, MA, RT und vpr, eingeschleust, aus welchem dann mithilfe der Integrase die Integration in die DNA der Wirtszelle eingeleitet wird. Vpr ist zuständig für die Kernlokalisierung des Komplexes. LTR am 5'-Ende fungiert als Promotor, wobei die viralen Transkripte durch die zelluläre RNA-Polymerase II synthetisiert werden. Mithilfe des Rev-Proteins werden prozessierte mRNAs in das Zytoplasma transportiert. Im Anschluss an die Translation gelangen gag- und gag-pol-Genprodukte an die Zellmembran. Das env-Vorläuferprotein wird am endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert.

Um die Hüllproteine gp41 und gp120 in die virale Hüllmembran einlagern zu können, müssen zunächst Wechselwirkungen zwischen env und CD4 unterbunden werden, was durch vpu unterstützt wird. CD4 wird degradiert, währenddessen env an die Zellmembran transportiert werden kann.

Ein neues, noch unreifes Virion wird durch Knospung freigesetzt. Die Neuordnung der Strukturproteine führt zur Reifung. Dies bedeutet, dass das Virion neben den zwei RNA-Kopien gag und gag-pol-Proteine enthält, die im späteren Verlauf mittels der Protease in ihre einzelnen Proteinkomponenten gespalten werden. Das nef-Protein induziert die endosomale Aufnahme und Vernichtung des CD4-Oberflächenrezeptors, um eine Reinfektion der Wirtszelle zu verhindern.

Zusätzlich zu den viralen Komponenten wurden in der letzten Zeit zelluläre Faktoren gefunden, die für den Erfolg der Replikation mitverantwortlich sein sollen. Dazu gehören Cyclophilin und Cyclin T. Daneben existieren auch Inhibitoren der Replikation: Vif bildet einen Komplex mit in humanen Zellen vorkommendem Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptide-like 3G (APOBEC3G), welches RNA modifiziert. Fehlt vif, so wird die virale Replikation blockiert.

Die Aktivierung der T-Zellen ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Integration, z.B. im Rahmen von HIV-Antigenkontakt oder anderen (opportunistischen) Infektionen. Ruhen die CD4-positiven T-Zellen im Organismus eines HIV-Infizierten, so wird die cDNA zunächst unvollständig synthetisiert und noch nicht in das zelluläre Genom eingebaut. Man spricht von einem latenten Infektionsstadium, in dem die inkomplett abgeschriebene cDNA relativ labil ist (Zack et al., 1990). Dennoch stellen die infizierten Zellen ein persistierendes Virusreservoir dar (Chun et al., 1997). Sogenannte provirale DNA, welche bereits integriert wurde, zeichnet sich hingegen durch eine stabile Struktur aus. Sie dient fortan als Matrize für virale Transkription und Replikation.

Werden die infizierten CD4-positiven T-Zellen erneut aktiviert, kommt es zur Virusvermehrung und nach einer gewissen Latenzzeit zur Zellzerstörung. Makrophagen, Monozyten, Langerhans-Zellen und interdigitierende retikuläre dendritische Zellen, in denen HIV persistiert, werden hingegen nicht zerstört.

2.2 Reverse Transkriptase

2.2.1 Funktion und Struktur

Virale Reverse Transkriptasen kommen ausschließlich in Hepadna- (insbesondere HBV-) und Retroviren vor. Im HI-Virus ist die Reverse Transkriptase für die reverse Transkription der einzelsträngigen Plus-Strang-RNA in cDNA zuständig. Diese RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet sowohl RNA als auch DNA als Matrizen. Die Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus der vorliegenden RNA-Matrize bedarf zunächst eines Primers. Für die Erststrangsynthese benötigt und verwendet das Virus die zelluläre tRNA^{Lys3}, die in einem 18 Nukleotide umfassenden Bereich mit der viralen RNA hybridisiert. Dieser RNA-Sequenzbereich entspricht der Primer Binding Site (PBS).

Sie setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, benannt nach ihrem Molekulargewicht: p51 und p66. Dabei ist p51 um 15 kD, d.h. 120 Aminosäuren kürzer als p66; dies ist die Konsequenz einer proteolytischen Spaltung am C-Terminus von p66. Somit sind die beiden Untereinheiten für die ersten 440 AS sequenzidentisch. Während p51 bislang nur strukturelle Funktionen zugeschrieben werden, zeichnet sich p66 durch verschiedene funktionelle Aktivitäten aus.

Das Enzym beginnt an Position 2550, welche für die Aminosäure Prolin kodiert, und endet an Position 4230 mit der Aminosäure Leucin. Innerhalb dieser Spanne von ca. 1680 Basenpaaren (d.h. 560 Aminosäuren) umfasst sie drei funktionelle Einheiten: aminoterminal die Polymerase Domain, C-terminal die RNase H-Domain und dazwischen die sogenannte Connection Domain (Kataba et al., 1993).

- Die Kristallstruktur der **Polymerase** erinnert an eine menschliche rechte Hand, an der man Finger, Daumen und Handballen unterscheiden kann (Kohlstaedt et al., 1992). Das aktive Zentrum (Positionen 110, 184, 185 und 186) im Bereich der Finger und am Übergang zum Daumen sind für die Transkription von RNA in den ersten DNA-Strang zuständig. Außerdem verwendet die Polymerase in einem zweiten Durchgang diese DNA als Matrize, um die reverse Transkription zu komplettieren und schließlich doppelsträngige DNA herzustellen.
- Die **RNase H** sorgt dafür, die RNA des entstehenden RNA-DNA-Hybrids zu hydrolysieren und zu vernichten. Das aktive Zentrum dieser Region liegt an den Positionen 443, 478, 498, 549.
- Im Bereich der **Connection Domain** ist der so genannte Primer Grip situiert, der eine entscheidende Rolle bei der korrekten Platzierung der Matrizen (sowohl RNA als auch DNA) spielt. Er umfasst die Positionen 359, 360, 361, 390, 395, 396, 473, 474, 475, 476, 501 und 505 (Sarafianos et al., 2001). Von diesen befinden sich die Positionen 390, 395, 396 in der p51-Untereinheit, die dadurch eine wesentliche Funktion bei der Bindung des Matrizenstranges erlangt (Julias et al., 2003; Delviks-Frankenberry et al., 2007).

Die Nukleinsäuren gleiten wie durch ein seitlich offenes Rohr durch das Molekül (Kataba et al., 1993; Yu et al., 1998). Möglicherweise waren Polymerase und RNase H-Domain ursprünglich separate Enzyme, die erst nachträglich durch die Connection Domain verbunden wurden (Arnold et al., 1995).

2.2.2 Dynamik

Hinsichtlich der Dynamik des Enzyms existieren verschiedene Vorstellungen. Einerseits wurde vermutet, dass die RNase H sich wie eine greifende Hand auf die Polymerase zu bewegt, wobei sie die RNA vorrangig alle neun bzw. alle 18 Nukleotide abschneidet (Gopalakrishnan et al., 1992; Palaniappan et al., 1996; Wisniewski et al., 2000, siehe Abbildung 4). Andererseits sollen Polymerase und RNase H eine fixierte Distanz zueinander aufweisen, die sie unabhängig voneinander arbeiten und funktionieren lässt (Schatz et al., 1990; Wohrl et al., 1990; Gopalakrishnan et al., 1992; Gotte et al., 1998; Sarafianos et al., 2001). Dennoch scheinen die beiden Domänen bis zu einem gewissen Grad hinsichtlich ihrer Aktivität miteinander verwoben zu sein (Tanese et al., 1988). Eine synergistische Hemmung beider Aktivitäten wurde durch die Zugabe von Foscarnet[®] nachgewiesen, welches an der Pyrophosphat-Bindungsstelle (Position 88) nahe dem aktiven Zentrum der Polymerase, andockt (Miller et al., 2005).

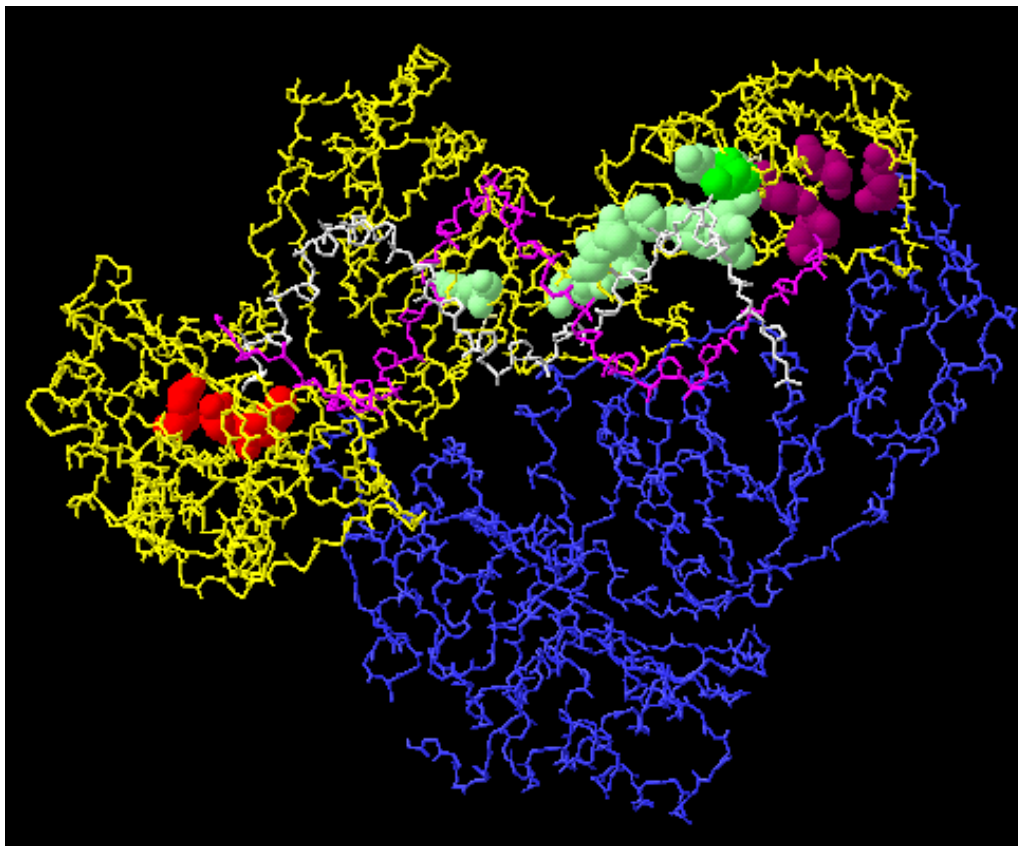


Abb. 4: Kristallstruktur der Reversen Transkriptase: aktives Zentrum der Polymerase (rot), aktives Zentrum der RNase H (violett), Primer Grip (grün) und DNA-Doppelstrang (violett/grau) (Ding et al., 1998)

2.3 Therapie

2.3.1 Therapeutika

Bislang existieren fünf Medikamenten-Klassen, die an diversen Orten im viralen Lebenszyklus angreifen und dadurch zu einer Hemmung der Replikation führen können: Rezeptor-Inhibitoren, Fusions-Inhibitoren, Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Integrase-Inhibitoren und Protease-Inhibitoren.

a) Rezeptor-Inhibitoren

Noch zeitlich vor den Fusionsinhibitoren hemmen die Rezeptor-Inhibitoren die Bindung des Virus an die Zielrezeptoren. Mit Maraviroc (Celsentri[®]) wurde in 9/2007 die erste Substanz in den USA sowie in Europa zugelassen.

b) Fusions-Inhibitoren

Zu den Fusions-Inhibitoren gehört das 2003 entwickelte Enfuvirtide (T20, Fuzeon[®]). Dieses lineare Peptid, bestehend aus 26 Aminosäuren, behindert den Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Da das Peptid dem HR2-Fragment der extrazellulären Domäne des viralen gp41-Proteins entspricht, verhindert die Bindung von T20 an gp41 die Fusion zwischen Virus und Wirtszelle. Nachteile dieses Medikamentes sind die hohen Synthesekosten sowie die Anwendung, die ausschließlich subkutan möglich ist (Kilby et al., 1998).

c) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Die Reverse-Transkriptase-Inhibitoren werden unterteilt in Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) und Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs).

(i) NRTIs

Zugehörig zur Gruppe der NRTIs, wurde 1987 der erste potente virale Hemmstoff, der spezifisch an der viralen Reversen Transkriptase angreift, entwickelt: Azidothymidin (AZT, 3'-Azido-3'-deoxy-thymidin, Zidovudin[®], siehe Abbildung 5). Alle Vertreter dieser Klasse weisen eine Modifikation an Position 3' des Zuckers auf. Die natürlicherweise im Desoxynukleotid vorkommende OH-Gruppe, die für die Ausbildung der Phosphodiester-Bindung notwendig ist, wird beim AZT durch eine Azido-Gruppe ersetzt (siehe Abbildungen 5 und 6). Durch diesen kompetitiven Mechanismus kommt es im Stadium der RNA/DNA-Transkription zu einem Kettenabbruch. Sobald die NRTIs in die Zelle gelangt sind, werden sie von zelleigenen Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert. Von diesem NRTI-Triphosphat wird Pyrophosphat abgespalten, um ein NRTI-Monophosphat erfolgreich in die zu synthetisierende DNA-Kette einbauen zu können.

AZT (Azidothymidin Retrovir[®])

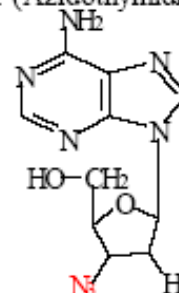


Abb. 5: Struktur des AZT: Die Azido-Gruppe an Position 3' ersetzt die natürlich vorkommende OH-Gruppe (Virustatika, 2007).

Die Wirkung der NRTIs ist spezifisch für die virale RT bzw. Polymerase der Reversen Transkriptase im Bereich des aktiven Zentrums. Die menschlichen Polymerasen alpha und beta werden um einen Faktor 100 schlechter inhibiert, die mitochondriale Polymerase gamma hingegen ebenso gut wie die virale. Weitere Vertreter der NRTIs sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Freiname	Handelsname
AZT (3'-Azido-3'-Deoxythymidin), Zidovudin	Retrovir®
d4T (2,3-Didehydro-2,3,-Dideoxthymidin), Stavudin	Zerit®
ddI (2',3'-Dideoxinosin), Didanosin	Videx®
3TC (2',3'-Dideoxy-3'-Thiacytidin), Lamivudin	Epivir®
ABC, Abacavir	Ziagen®
FTC, Emtricitabin	Emtriva®
ddC (Dideoxycytosin), Zalcitabin	Hivid®
TNV, Tenofovir	Viread®

Tab. 1: Vertreter der Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)

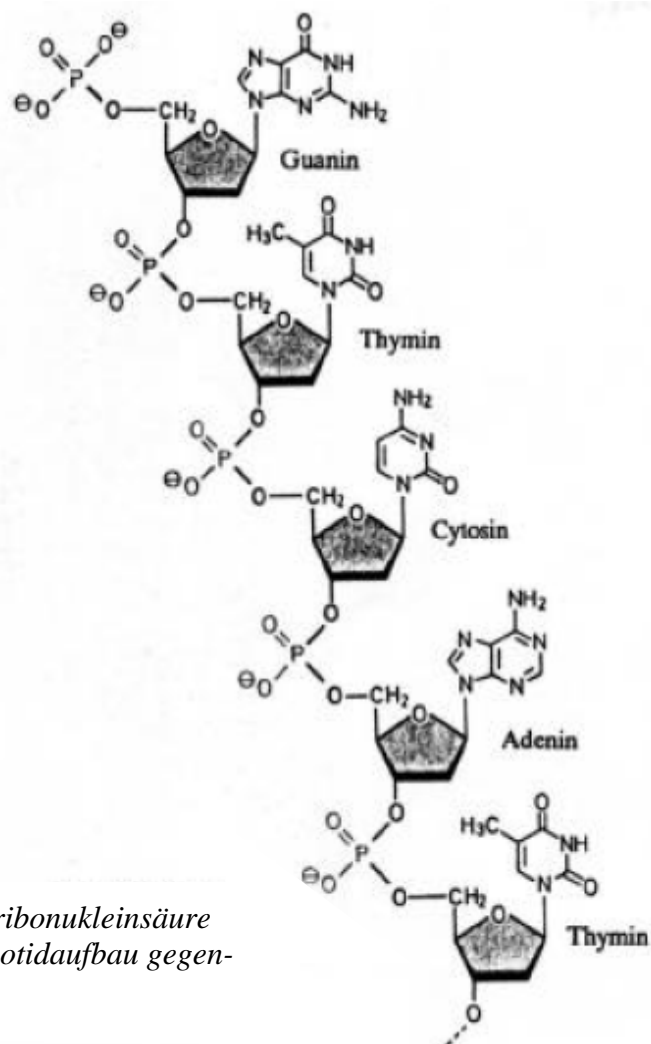


Abb. 6: Formelausschnitt der Desoxyribonukleinsäure (Virustatika, 2007): natürlicher Nukleotidaufbau gegenüber der NRTI-Struktur

(ii) NNRTIs

Der erste nicht-nukleosidische Hemmstoff, Nevirapin, wurde 1996 zugelassen. 10 bis 15 Åström vom aktiven Zentrum der Polymerase entfernt, binden die NNRTIs in einer hydrophoben Tasche. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung in der Reversen Transkriptase, was wiederum zur Inhibition der Polymerase-Aktivität führt. Im Gegensatz zu den NRTIs weisen die Vertreter dieser Klasse sehr unterschiedliche Strukturmerkmale auf, die in keiner Hinsicht analog zu den natürlichen Nukleotiden bzw. Nucleosiden sind. Weitere Vertreter führt Tabelle 2 auf.

d) Integrase-Inhibitoren

Als erster Wirkstoff dieser Substanzgruppe gilt Raltegravir (Isentress[®]), seit 2/2008 zugelassen in Deutschland.

e) Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren existieren seit 1995. Sie setzen am homodimeren Enzym Protease an, dessen Reaktionszentrum innerhalb einer hydrophoben Dimerisierungsfläche zu finden ist. Die meisten Protease-Inhibitoren sind Peptidanaloga und fungieren als Substratkompetitoren. Aminosäuren, die die Abfolge an der Protease-Schnittstelle stellen, finden sich in den Analoga wieder. Die Inaktivierung der Protease verhindert die Ausbildung reifer, replikationsfähiger Viren. Vertreter finden sich in Tabelle 3.

Tab. 2: Vertreter der Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)

Freiname	Handelsname
Efavirenz (EFV)	Sustiva [®]
Delavirdin (DLV)	Rescriptor [®]
Nevirapin (NVP)	Viramune [®]
Etravirin	Intelence [®]

Tab. 3: Protease-Inhibitoren

Freiname	Handelsname
Amprenavir	Agenerase [®]
Atazanavir	Reytaz [®]
Fosamprenavir	Telzir [®]
Indinavir	Crixivan [®]
Nelfinavir	Viracept [®]
Squinavir	Invirase, Fortovase [®]
Tipranavir	Aptivus [®]
Darunavir	Prezista [®]

2.3.2 Resistenzmechanismen (Castro et al., 2006; Johnson et al., 2006)

Sowohl NRTIs als auch NNRTIs führen im Rahmen einer monotherapeutischen Behandlung rapide zu Resistenzen, so dass in der Regel Kombinationstherapien empfohlen und durchgeführt werden. Mögliche Kombinationen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Die abnehmende Empfindlichkeit der Viren ist auf die hohe Variabilitätsfähigkeit (Fehlerrate) der Replikation der Viren zurückzuführen, die mit einer fehlenden Exonucleasefähigkeit einhergeht. Somit wird pro 2000-5000 Nukleotide eine falsche Base in die provirale DNA eingebaut (Mansky et al., 1995). Ebenso weist die humane RNA-Polymerase II eine geringe Genauigkeit bei der mRNA-Synthese auf. Dies führt letztendlich zu einer hohen genetischen Diversität des viralen Genoms. Mutationen, die also zu einer Resistenz gegenüber eingesetzten Inhibitoren führen, werden innerhalb weniger Replikationszyklen selektiert. Die antiretrovirale Wirkung nimmt ab.

Nachfolgend werden die bekannten Resistenzmechanismen erläutert. Dazu zählen jene, die unter NRTI-, NNRTI- und Protease-Inhibitor-Therapie zu Resistenzmutationen führen.

a) NRTI-Resistenzmechanismen

Bei der Resistenz gegenüber NRTIs werden zwei Mechanismen unterschieden: NRTI excision (Arion et al., 1998; Meyer et al., 1999; Goldschmidt et al., 2004) und NRTI discrimination (Sarafianos et al., 1999).

(i) NRTI excision

Die Mutationen, die der NRTI excision zugrunde liegen, treten als so genannte Thymidine Analog Mutations (TAMs) an folgenden Positionen auf: M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219Q – alle nahe am aktiven Zentrum der Polymerase gelegen. Durch die Mutation kommt es zu einer höheren Abspaltungsrate von NRTI-Monophosphaten aus der nativen DNA-Kette. Die DNA-Synthese kann dann fortgesetzt werden, die Therapie versagt.

(ii) NRTI discrimination

Die NRTI discrimination ist im Zusammenhang mit Mutationen zu beobachten, die im Bereich der Finger auftreten. Es handelt sich um Aminosäureaustausche an folgenden Positionen: K65R, K70E, L74V, Q151M, komplexiert mit A62V, V75I, F77L, F116Y und M184V. Da dieser Bereich für die Bindung des zunächst einzubauenden desoxyNukleosid TriPhosphat (dNTP) zuständig ist, kommt es hier zu einer Präferenz der Reversen Transkriptase für die natürlichen dNTPs gegenüber den NRTI-Triphosphaten, d.h. anstelle des Inhibitors werden dNTPs eingebaut, so dass die DNA-Synthese uneingeschränkt erfolgen kann.

Tab. 4: NRTI-Kombinationsvorschläge (Ruß et al., 2005)

Freiname (Abkürzung)	Handelsname
3TC + AZT	Combivir®
3TC + AZT + ABC	Trizivir®
3TC + ABC	Kivexa®
TDF + FTC	Truvada®

M184V ist gleichzeitig Teil des aktiven Zentrums der Polymerase, ein einzelner Aminosäureaustausch an dieser Position vermittelt Resistenz gegenüber 3TC/FTC. Betaverzweigte Aminosäuren wie Valin, Isoleucin oder Threonin interferieren mit dem Inhibitor, woraus eine sterische Blockade für den Oxathiolenring des 3TC entsteht. In einer Kombinationstherapie mit AZT kommt es jedoch gleichzeitig zu einer höheren Sensitivität des Enzyms gegenüber AZT, so dass diese Kombination bei Therapieversagen unter Monotherapie mit AZT und trotz absoluter Resistenz gegenüber 3TC eine potente Alternative darstellt (Sarafianos et al., 1999; Götte, 2007).

b) NNRTI-Resistenzmechanismen

Zu Resistenz gegenüber NNRTIs führen bereits Punktmutationen innerhalb der Sequenz der Reversen Transkriptase. Man unterscheidet drei Aminosäurebereiche, in denen diese auftreten: 98-108, 179-190 und 225-236. Diese Mutationen reduzieren die Wechselwirkungen, welche zwischen den polyzyklischen Inhibitoren und der Reversen Transkriptase stattfinden.

c) Protease-Inhibitor-Resistenzmechanismen

Auch für die Gruppe der Protease-Inhibitoren sind Mutationen bekannt, die zu Resistenz führen. Diese befinden sich meistens im Bereich der Substratbindungstasche. Für eine komplette Resistenz sind Aminosäureaustausche an mindestens zwei Positionen nötig.

2.3.3 Highly Activated Antiretroviral Therapy (HAART)

Highly Activated Antiretroviral Therapy (HAART) bezeichnet die kombinierte Gabe von drei oder mehr antiretroviralen Medikamenten (meistens ein oder zwei NRTIs, ein NNRTI und/oder ein Protease-Inhibitor). Dies führt zu höherem Therapieerfolg und somit längeren Latenzzeiten (Zack et al., 1990). Die Akkumulierung von Resistenzmutationen wird insofern verlangsamt, als die Blockade der viralen Replikation an verschiedenen Punkten stattfindet. Jedoch geht diese Kombinationstherapie weiterhin mit Nebenwirkungen einher (gastrointestinale Nebenwirkungen, Blutbildänderungen, Störungen des Zentralen Nervensystems, Lipotrophie, Dyslipidämie, Knochendichte-Veränderungen, Nierenfunktionsstörungen). Außerdem gelangt HAART nicht in alle HIV-Reservoirs des Körpers, so dass eine vollständige Eradikation des Virus noch nicht erreicht wurde. So bleibt die virale Replikation unter HAART-Therapie etwa im Zentralen Nervensystem erhalten.

Es werden daher weitere potentielle therapeutische Angriffspunkte untersucht. So werden bislang die Zielorte auf die Integrase ausgedehnt. Raltegravir (Isentress[®]), erster Wirkstoff dieser Substanzgruppe, ist seit 2/2008 in Deutschland zugelassen.

Weiterhin werden die Mechanismen der RNase H-Einheit seit einigen Jahren verstärkt erforscht. Insbesondere wurden u.a. Hydroxytropolone als mögliche Inhibitoren gegen die RNase H-Funktion getestet (Budhias et al., 2005). Kürzlich wurde die These der Selbst-Inaktivierung der Replikation mittels der RNase H, welche über Doppelstrang-Oligodesoxynukleotide hoch spezifisch an den stark konservierten Polypurintrakt der RNA binden soll, veröffentlicht. In Mäusen wurde erfolgreich nachgewiesen, dass dies zu einer frühzeitigen RNase H-Aktivität führt, welche RNA abbaut, bevor der DNA-Strang synthetisiert wird (Matzen et al., 2007).

Bis dato haben sich keine Inhibitoren für die RNase H-Region erfolgversprechend etabliert. Dies liegt u.a. daran, dass verschiedentlich (Margolis, 2007) vermutet wird, dass eine erhöhte RNase H-Aktivität (z.B. getriggert durch die Gabe und Präsenz von EFV(NNRTI)) zu einer Senkung der therapeutischen Wirkung von AZT (NRTI) führt, bei zeitgleicher Anwendung. Es stellte sich also die Frage, ob und wenn inwiefern eine Inhibition der RNase H therapeutisch sinnvoll sein könnte.

Götte et al. (1998) haben diesbezüglich herausgefunden, dass b-Thujaplicinol nur dann das aktive Zentrum der RNase H erreichen konnte, wenn die Reverse Transkriptase nicht gerade in der Polymerase-Region arbeitet. Hieraus folgt, dass weitere Analysen notwendig sind, in denen auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Hemmstoffen verschiedener Substanzgruppen geprüft werden sollten.

3 Motivation

3.1 Aktuelle Arbeiten

In den letzten Jahren sind der Connection-Bereich und die RNase H-Untereinheit der Reversen Transkriptase von HIV-1 vermehrt in den Fokus des Interesses und der Forschung geraten. Denn diese Bereiche könnten neben den herkömmlichen medikamentösen Angriffspunkten ein eigenständiges potentes Ziel bieten (siehe Abschnitt 2). Zwar gibt es verschiedene Theorien zum Arbeitsmechanismus des Enzyms, doch muss seine Funktionskinetik als noch nicht verstanden angesehen werden. Insbesondere erlauben die bisherigen Arbeiten keine fundierte Antwort auf die Leitfrage der vorliegenden Arbeit, ob die Connection- und/oder RNase H-Mutationen in die herkömmlichen Resistenzanalysen eingeschlossen werden sollten.

3.1.1 RNase H-Funktion und -Inhibition

Der funktionelle Mechanismus im aktiven Zentrum der RNase H wurde intensiv untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Aktivität in einem Milieu von zweifach positiv geladenen Metallionen, bevorzugt Mn^{2+} , stärker war als bei Co^{2+} - oder Mg^{2+} -Zugabe (Klumpp et al., 2003). Daraufhin wurden N-Hydroxyimide eingesetzt, die mit zwei Metallionen interagieren; eine Reduktion der RNase H-Aktivität konnte verzeichnet werden. Außerdem war die Bindung dieser Inhibitoren spezifisch (Klumpp et al., 2003).

Bislang haben sich entwickelte Stoffe wie die Hydroxytropolone nicht durchgesetzt, da deren Toxizität auf zelleigene Enzyme den inhibierenden Effekt der RNase H-Funktion überlagerte (Margolis, 2007).

Der RNase H-Inhibitor Dihydroxyl-Benzoyl-Naphtyl-Hydrazon (DHBNH) bindet über 50 Ångström vom aktiven Zentrum der RNase H entfernt, nahe der NNRTI-Bindungstasche und dem aktiven Zentrum der Polymerase. Er wirkt effektiv gegen eine Vielzahl resistenter Mutanten der Reversen Transkriptase; hohe Konzentrationen werden benötigt, um die RNA-abhängige DNA-Synthese zu inhibieren. Eine kombinierte Hemmung beider Funktionen, der Polymerase und RNase H, wird vermutet und derzeit untersucht (Himmel et al., 2006).

3.1.2 Einfluss von Mutationen auf die Funktion von RNase H bzw. Reverser Transkriptase

Bereits 2001 mutierten Julias et al. Reverse Transkriptasen von HIV-1. Die Punktmutation D110E im aktiven Zentrum der Polymerase wurde jeweils mit Mutationen an den Positionen D443 und E478Q, beide im aktiven Zentrum der RNase H gelegen, kombiniert. Eine Aktivitätsreduktion beider aktiver Zentren (Polymerase und RNase H) wurde verzeichnet. Dieses Resultat und andere (In-vivo-Studie 2008, Santos et al.) belegt die notwendige hohe Konservierung der Positionen, welche das katalytische Zentrum der RNase H-Region formen (Julias et al., 2001).

2002 testeten Julias et al. den Einfluss von Mutationen in der Connection Domain auf die Replikationsfähigkeit der Reversen Transkriptase bzw. der RNase H-Funktion (Julias et al., 2002, 2003). Mutationen an den Positionen 395 und 396 in der Connection Domain, die als Teil des Primer Grips der p51-Untereinheit Kontakt zum Template haben, führten aufgrund einer schwächeren Nukleinsäuren-Bindung zu einer reduzierten RNase H-Funktion. Dieser Effekt scheint sich eher auf unspezifische Aktivitäten der RNase H insgesamt auszuüben als

auf die Spezifität des Degradationsvorgangs der RNA (Julias et al., 2003). Radzio et al. (2007) konnten biochemisch einen positiven Einfluss von Efavirenz auf die RNase H-Funktion nachweisen, wodurch die Exzision von AZT vermindert wurde. Es zeigte sich, dass die Steigerung der Degradierung durch die RNase H zu einer Verkürzung des Hybridstranges auf weniger als 10 Nukleoside führte, wodurch sich die Affinität der RT zu diesem Strang vermindert zeigte. Die Vermutung wurde abgeleitet, dass aufgrund dessen AZT vermindert herausgeschnitten wurde

3.1.3 Auswirkungen von Mutationen auf Resistenzmechanismen

Gezielte Mutationen der Aminosäuren des Primer Grips wurden von Delviks-Frankenberry et al. (2007; 2008) vorgenommen. Mutierte Positionen in der Connection Domain wurden mit TAMs, mit Wildtyp und mit einer der Finger-Mutationen, K65R, kombiniert und auf ihren Einfluss auf die Resistenz gegenüber NRTIs, namentlich AZT, geprüft. Es stellte sich auch in dieser Studie heraus, dass Veränderungen im Bereich des Primer Grips einen weitläufigen hemmenden Effekt auf die RNase H-Funktion, aber auch eine Resistenzhöhung gegenüber AZT zur Folge haben.

Zuvor bereits hatten Nikolenko et al. (2004) vermutet, dass zwischen den Aktivitäten der RNase H und denen der Polymerase ein Gleichgewicht bestehen müsse – der sogenannte Dynamic-copy-choice-Mechanismus. Die Gruppe postulierte, belegt durch In-vitro-Experimente mit gezielten Punktmutationen, dass Aminosäureaustausche (Mutationen), die im Rahmen einer NRTI-Therapie in der RNase H-Domain selektiert wurden, die RNase H-Aktivität reduzieren und damit der Rate der Exzision von NRTI-Monophosphaten aus dem DNA-Strang in der Polymerase Vorschub leisten. In diesem Zusammenhang wurde eine Resistenzhöhung gegenüber NRTIs, insbesondere AZT, vermutet (Nikolenko et al., 2005). Gleichzeitig wurde getestet, ob Mutationen in der RNase H-Domain unabhängig von TAMs oder anderen Resistenz-Mutationen eine Auswirkung auf Resistenzmechanismen haben könnten (Nikolenko et al., 2005). Zwei Positionen, 539 und 549, wurden gezielt punktmuiert und zeigten in der Auswertung eine erhöhte Resistenz gegenüber AZT; durch Mutationen an diesen beiden Positionen hatten bereits Tisdale et al. (1991) eine Reduktion der Funktion beider aktiver Zentren nachgewiesen. 2005 wurde für diese Positionen ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Resistenzsteigerung gegenüber AZT festgestellt, die den Effekt bei nur vorhandenen TAMs übertraf (Nikolenko et al., 2005). Darüber hinaus lassen die Ergebnisse der Studie vermuten, dass eine effektive Limitation der DNA-Synthese (durch effektive Inkorporation von NRTIs in den DNA-Strang) nur während der RNA-abhängigen DNA-Synthese möglich ist, da die RNA-Degradation durch die RNase H die Zeit für eine mögliche Exzision von NRTIs begrenzt (Nikolenko et al., 2005).

Da keine Veränderungen hinsichtlich der Resistenz gegenüber Efavirenz (EFV), einem Vertreter der NNRTIs, festgestellt wurden, lässt sich resümieren, dass dieser Hemmstoff durch Mutationen im RNase H-Bereich nicht beeinflusst wird (Nikolenko et al., 2005). Vielmehr wird eine irreversible Bindung dieses Inhibitors angenommen (Nikolenko et al., 2005), vermutlich reduziert er gar die AZT-Entfernung (Radzio et al., 2007)

2006 klonierten Nikolenko et al. die RNase H-Domain von sieben unbehandelten und acht therapierten Patienten in HIV-1-Vektoren, die entweder mit einer Wildtyp- oder einer therapieresistenten, TAMs enthaltenden Polymerase kombiniert waren (Nikolenko et al., 2006). Während die Sequenzen der unbehandelten Patienten keine Veränderung hinsichtlich der AZT-Empfindlichkeit aufwiesen, zeigte sich bei der Kombination behandelt/Wildtyp-Polymerase eine geringfügige Resistenzsteigerung, die in der Kombination behandelt/TAMs-

Polymerase noch stärker ausfiel (nämlich bei fünf von acht Patientensequenzen auftrat, Nikolenko et al., 2006). An folgenden Positionen der Connection Domain wurden Mutationen gefunden, die im Zusammenhang mit TAMs die Resistenz gegenüber AZT signifikant verstärkten (Nikolenko et al., 2007): 312, 335, 348, 360, 365, 376. Götte (2007), Yap et al. (2007), Ehteshami et al. (2008), Hachiya et al. (2008) und Delviks-Frankenberry et al. (2008) bestätigen die hohe Prävalenz der AZT-abhängigen Mutation an Position N348I.

Im Nachgang zu den Experimenten der Gruppe Nikolenko et al. führten Roquebert et al. (2007) als erste Gruppe In-vivo-Untersuchungen an 118 behandelten und 26 untherapierten Patientenseren durch. Die RNase H-Domain wurde komplett sequenziert und die Ergebnisse mit HXB2, der Standard-Referenzsequenz des Subtyps B, verglichen. Dabei wurden vier Positionen (469, 470, 554, 558) gefunden, die in der Gruppe der behandelten Patienten statistisch signifikant häufiger mutiert waren als bei den Unbehandelten. Die in vitro punktmutierten Positionen 539 und 549 (Nikolenko et al., 2005) wurden in dieser Studie nicht gefunden. Bei genauer Betrachtung der dreidimensionalen Kristallstruktur der Reversen Transkriptase von HIV-1 bzw. der RNase H-Region lässt sich eine Nähe der hier gefundenen Mutationspositionen sowohl zum aktiven Zentrum als auch zum Primer Grip nachweisen (Roquebert et al., 2007). Eine weitere Differenzierung konnte zwischen TAMs und anderen NRTI-Resistenzmutationen gezogen werden: Mutationen in der RNase H-Domain traten fast ausschließlich in Kombination mit TAMs auf, d.h. unter Therapie mit Thymidin-Analoga wie AZT (Roquebert et al., 2007). Anderen NRTIs wie 3TC wird eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Pyrophosphorolyse zugesprochen (Nikolenko et al., 2004).

Brehm et al. (2007, 2008) vervollständigten die jüngsten Studien von Roquebert et al. (2007) und Nikolenko et al. (2007), indem sie sowohl die Connection als auch die RNase H-Domain sequenzierten und mit Wildtyp- bzw. TAM-haltigen Polymerasen kombinierten. Positionen 371 und 509 zeigten einzeln und gemeinsam eine ausgeprägte Resistenzsteigerung in Kombination mit TAMs, insbesondere mit den TAM-Kombination D67N+K70R.

Santos et al. (2008) fanden in einem brasilianischen Patientenkollektiv weitere unter Therapie entstandene Mutationen in In-vivo-Studien. Hier wurde vorrangig Subtyp B untersucht.

3.2 Fragestellung der Arbeit

Die Leitfrage der vorliegenden Arbeit, ob die Connection und/oder RNase H-Mutationen in die herkömmlichen Resistenzanalysen einzuschließen sind, lässt sich aus den bisherigen Arbeiten heraus nicht fundiert beantworten. Sie untersuchen die genannten Bereiche lediglich in vitro – mit den üblichen Unsicherheiten bei der Bewertung. Oder sie lassen die Subtypen des HIV-1 unberücksichtigt – von denen bekannt ist, dass sie ganz spezifische Mutationen hervorbringen können. Darüber hinaus verwenden die meisten Arbeiten ein nicht genügend genau spezifiziertes Wildtyp-Virus als Referenz – was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse stark einschränkt.

Demzufolge lassen sich die Fragen an die vorliegende Arbeit wie folgt formulieren:

- Treten Mutationen in der RNase H sowohl unter Therapie (in Kombination mit TAMs) als auch bei unbehandelten infizierten Patienten auf?
- Gibt es diesbezüglich unterschiedliche Ausprägungen zwischen den einzelnen Subtypen?
- Benötigt man erweiterte Sequenzanalysen in der Region der Connection und/oder RNase H Domäne, um Resistenzen gegen NRTIs und NNRTIs voraussagen zu können?

4 Experimente

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Zentrifugen: Hettich (Tuttlingen),

- Rotanta 460 R
- EBA 12

Schüttler: IKA, [®]MS2 Minishaker

Thermozycler:

- Biometra UNO II, Thermoblock Nr. 9609133, Serial Nr. 3911335 (biomedizinische Analytik, Göttingen)
- PE Applied Biosystems, Gene Amp[®], PCR-Systems 9700, Version 2,25, Serial Nr. 805S8113017, Part.Nr. N8050200 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)

Waage: Sartorius Laboratory, L310

Wärmegeräte:

- Krups, Mikrowelle Type 785
- Memmert (Schwabach), Brutschrank Typ B10 (F-Nr. 860353)
- Bachofer Laboratoriumsgeräte, Metallblock Thermostat Typ 2099 (Reutlingen)

Electrophoresis Power Supply:

- Biotech-Fischer, Phero-Stab 324
- PEQLAP, EV265

Gel-Fotoapparat:

Herolab, E.A.S.Y. 442 K, Serial Nr. 384/06, Software Serial Nr. 1280925388

Sequenzier:

Beckman Coulter, CEQ[™] 8800 Genetic Analysis System (Ser. Nr. 390 880 0017)

4.1.2 Zubehör

Erlenmeierkolben: Fisherbrand, 300 ml

Safe Lock Tubes: Eppendorf,

- 0,5 ml (order no. 0030 121.023, autoklaviert)
- 1,5 ml (order no. 0030 120.086, autoklaviert)

Pipettenspitzen: Biozym[®], SafeSeal-Tips[®]

- 10 µl (Artikel-Nr.692150)
- 20 µl (Artikel-Nr. 692151)
- 100 µl (Artikel-Nr. 692066)
- 200 µl (Artikel-Nr. 692069)
- 1 ml (Artikel-Nr. 692079)

Ungestopfte Pipettenspitzen:

- Sarstedt (Standort Nümbrecht), 200 µl, gelb (Nr. 70.760.002), selbst autoklaviert
- Eppendorf, PCR quality, bis 10µl (Nr. 0030073746)

PCR-Gefäße: Molecular BioProducts, 0,2 ml PCR Tubes (Flat Cap, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei), Katalog-Nr. für alle: 3412

- Weiß (Lot-Nr. 507036)
- Blau (Lot-Nr. 448065)
- Violett (Lot-Nr. 07050435)
- Grün (Lot-Nr. 426061)
- Rot (Lot-Nr. 06241031)
- Orange (Lot-Nr. 541452)
- Gelb (Lot-Nr. 06320453)

Siedesteinchen: Merck, 2-8 mm, 100g (Art.-Nr. 1.07913.0100)

4.1.3 Reagenzien

B Braun (Melsungen): Aqua ad iniectabilia Zul.- Nr. 67240920000

Fresenius (Bad Homburg):

Ampuwa, Spüllösung steril und pyrogenfrei, Code: 30-29-256, Ref: 1080181

Merck:

- Ethanol absolut (Nr. 1.00983)
- Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Nr. 1.08382.2500)
- Borsäure (Nr. 1.00165.5000)
- EDTA 0,5 M, pH 8,0 (Nr. 1.12029.1000)
- Ethidiumbromid 1%-ige Lösung (Nr. 1.11608.0030)
- Tris-HCL (pH 7, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1m Methylendiamine, Tetraacetic acid (EDTA) stabilizers, 50% Glycerol)

Biozym Scientific GmbH: Biozym LE Agarose (ArtIKEL-Nr. 840004)

Roche Applied Science (Mannheim):

- DNA Molecular Weight Marker VIII (0,019-1,11 kbp) 50 µg (250 µg/ml) (Cat. No. 11 336 045 001)
- Für den Marker-Ansatz wurden 250 µl Marker VIII mit 550 µl Auftragspuffer und 1.750 µl sterilem aqua dest. gemischt.
- DNA Molecular Weight Marker XVII (0,5-5 kbp) 250 µg, Cat.No.11 855 646 001, gelöst in 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8)
- Für den Marker-Ansatz wurden 200 µl Marker XVII mit 200 µl 4x-Auftragspuffer (1 ml 10x-TBE, 6 ml Glycerin (Merck, Darmstadt, 87%, K19890494), 3 ml H₂O) und 400 µl H₂O gemischt.
- Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade (Cat. No. 1 969 064)
- Für den 5 mM-Ansatz wurden von jedem Nukleotid 250 µl zusammenpipettiert und zu 4 ml sterilem aqua dest. gegeben.
- Für den 10 mM-Ansatz wurden von jedem Nukleotid 500 µl zusammenpipettiert und zu 3 ml sterilem aqua dest. gegeben.
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Nr. 11 858 875 001) enthält:
 - Binding Buffer 2x, 25 ml
 - Poly(A) Lyophilisat, 2 mg poly(A) carrier RNA
 - Proteinase K Lyophilisat 100 mg
 - Inhibitor Removal Buffer 33 ml (20 ml Ethanol absolut zugegeben)
 - Wash Buffer 2x 10 ml (je 40 ml Ethanol absolut zugegeben)
 - Elution Buffer 30 ml
 - High Pure Filter Tubes
 - Collection Tubes 2 ml

Invitrogen: Superscript™ II, RNase H⁻ Reverse Transkriptase – Kit (Nr. 18064-014) enthält:

- SuperScript™ II Reverse Transkriptase 100.000 U, 200 U/μl (Cat no 18064-014)
- 5x First Standart Buffer, 1 ml
- 0,1 M DTT, 500 μl

Roche Applied Biosystems (Mannheim):

- AmpliTaq Gold® Polymerase – Kit (Nr. N808-0245) enthält:
 - AmpliTaq Gold® Polymerase 250 U, 5 U/μl
 - 10x PCR Buffer II, 1,5 ml (enthält kein MgCl₂)
 - MgCl₂ Solution 25 mM, 1,5 ml
 - (2) Taq (10x Buffer, 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCL, pH 7,5 (25°), 100 mM KCL, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v), 50% Glycerol)

GE Healthcare (Freiburg):

(1) Taq (270799-64 Taq DNA Polymerase, lot 324573, 5000 units/ml, Lösung in 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM Ethylendiamine tetraacetate (EDTA), stabilizers, 50% glycerol); 30799 10x Buffer (lot 324574), 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂, 100mM Tris-HCL (pH 9, Raumtemperatur)

Agencourt®:

- AMPure® PCR Purification
- Magnetic Particle Solution
- Clean SEQ® DYE-Terminator Removal
- Magnetic Particle Solution
- 96 well cycling plate
- SPIRIPlate96R ring magnetic plate (Nr. 000219)

Beckman Coulter®:

- GenomeLab™ Separation Buffer 4x, 30 ml (Nr. 608012)
- Separation Gel: LPA I (Nr. 391438)
- Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (P/N 608120) enthält:
 - DTCS Quick Start Master Mix
 - pUC18 Control Template (0,25 μg/μl)
 - M13 -47 Sequencing Primer (1,6 pmol/μl)
 - Glycogen (20 mg/ml)
 - Mineral Oil
 - Sample Loading Solution (SLS)

ABgene: Plate Seals (Nr. AB-3739)

4.1.4 Software

- Bioedit
- Microsoft Office
- Pregap
- Gap4
- Beckman coulter software
- Blast
- Primer3
- Primer express
- Primalign (LANL, <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)
- Swiss pdb viewer
- Graph Pad Prism 4.0

4.1.5 Patientenmaterial

Es wurden Restseren von Patienten aus dem Pool des Pettenkofer-Instituts, München, ausgewählt, die im Laufe des letzten Jahres vor einer Therapieeinstellung bzw. unter Therapie auf Resistenzen getestet wurden. Die Sequenzen für den Bereich der Polymerase lagen vollständig vor (siehe Anhang A.2).

Da Subtyp B der Gruppe M in Deutschland den am häufigsten vorkommenden Subtyp stellt und somit auch der am häufigsten therapierte ist, wurde der Fokus der Untersuchungen darauf gelegt. Aus Interesse wurden weiterhin Sequenzen anderer Subtypen, vorrangig A bzw. solche, die im Bereich der Polymerase Subtyp A am ähnlichsten kamen, studiert – unter anderem, um mögliche subtypenspezifische Differenzen erkennen zu können (siehe Anhang A.2).

Es wurden Serum- bzw. Plasmaproben von 55 Münchner HIV-infizierten Patienten untersucht, von denen 48 dem Subtyp B angehören (siehe Tabelle 5). Von diesen 48 Patienten wurden die Sequenzen zweier Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer jeweiligen Therapiegeschichte analysiert (siehe Tabelle 5, Kennzeichen * bzw. **). Von den 48 Patienten waren 28 behandelt und 20 unbehandelt.

4.1.6 Referenzsequenz

Für eine subtypenspezifische Auswertung der Untersuchungen wurde für die beiden Subtypen A und B jeweils eine Referenzsequenz generiert. Öffentlich verfügbar in einer Datenbank des Los Alamos National Laboratory (LANL), sind 690 Sequenzen aller HIV-Typen aufgeschlüsselt. Diese wurden an ca. 20 Positionen, die regelmäßig unter Therapie mutieren und dadurch selektiert werden, daraufhin überprüft, ob eine vorhergehende Therapie stattgefunden hatte.

Die für die Bewertung der Ergebnisse heranzuziehende Referenzsequenz sollte keine behandelten Fälle beinhalten, so dass 40 Sequenzen eliminiert wurden. Aus den verbleibenden 650 Sequenzen wurden jeweils eigene Consensussequenzen für Subtyp B (92 Sequenzen) und für Subtyp A (110 Sequenzen) berechnet und als Grundlage für den Vergleich und die Bewertung der Ergebnisse verwendet.

Dies war unter anderem wichtig, um mögliche Unterschiede an vereinzelt Aminosäure-Positionen, die subtypenspezifisch sein könnten, korrekt interpretieren zu können (siehe Abschnitt 5.3).

Patienten-ID	Subtyp	TAMs	Behandelt	Unbehandelt
16681	Cons_B (Pol) (CRF_11)	0	X	
24615	B	X	X	
7360	B	X	X	
35306**	B	X	X	
16095**	B	X	X	
63233	B	X	X	
41431	B	X	X	
11167	B	0	X	
27744	B	X	X	
12515	B	0	X	
40494	B	X	X	
12303	B	0	X	
3386*	B	0	X	
15095	B	X	X	
14668	B	X	X	
28718	B	X	X	
31406*	B	0	X	
40599	B	X	X	
30242	B	X	X	
13657	B	X	X	
42954	B	X	X	
11430	B	0	X	
36037	B	X	X	
8109	B	0	X	
16681	B	0	X	
20612	B	X	X	
18249	B	0	X	
25778	B	0	X	
23218	B	X	X	
22303	B	0	X	

Patienten-ID	Subtyp	TAMs	Behandelt	Unbehandelt
11315	B			X
11612	B			X
14450	B			X
9240	B			X
10701	B			X
14720	B			X
16994	B			X
15627	B			X
14667	B			X
07553	Cons_B (CRF_12)			X
02796	B			X
19512	B			X
21961	B			X
22186	B			X
22233	B			X
23112	B			X
24267	B			X
24656	B			X
24757	B			X
24804	B			X
30845	A	X	X	
13205	A	X	X	
35195	A (CRF01_AE)	0	X	
14719	Cons_AA			X
11168	A			X
1717	CRF_6			X
26478	Mosaik			X

Tab. 5: Patientenproben von Subtyp B: behandelte (rot hinterlegt), unbehandelte (gelb), * bzw. ** jeweils derselbe Patient zu unterschiedlichen Zeitpunkten; Patientenproben von Subtyp A: behandelte (orange), unbehandelte (weiß); Nicht zuzuordnende Subtypen: nur un-behandelte (hellblau). „0“: nicht vorhanden, „X“: vorhanden

4.2 Methoden

4.2.1 Primer und ihr Design

Alle Primer wurden von der Ella Biotech GmbH, Martinsried, hergestellt und mit sterilem Aqua dest. auf 10 pmol/l eingestellt (siehe Abbildung 7):

Für die RNase H-Region:

- 1. PCR:**
RNase A: 5'-TGG GGA AAG ACT CCT AAA TT-3' (3696-3715)
RNase B: 5'-CTA CAG TCT ACT TGT CCA TG-3' (4399-4380)
- 2. (nested) PCR:**
RNase C: 5'-GAA ACA TGG GAA ACA TGG TG-3' (3735-3754)
RNase D: 5'-GCT ACT ATT TCT TTT GCT AC-3' (4342-4323)

Für die Connection Domain:

- 1. PCR:**
CnA₁: 5'-CAR GAC TTY TGG GAA GTY C-3' (2802-2820)
CnA₂: 5'-CAR GAC TTY TGG GAA GTT C-3' (2802-2820)
CnB: 5'-ACT CCC AYT CAG GAA TCC A-3' (3795-3777)
- 2. (nested) PCR:**
CnC₁: 5'-ATT AGG AAT ACC RCA YCC-3' (2822-2839)
CnC₂: 5'-AYT AGG AAT ACC RCA YCC-3' (2822-2839)
CnD₁: 5'-ATC CAG GTG GCY TGG CA-3' (3781-3765)
CnD₂: 5'-ATC CAG GTG GCY TGG CAA-3' (3781-3765)

Überlappend für RNaseH-Region und Connection Domain:

- 2. (nested) PCR:**
CnrE: 5'-GGA GTT RTA TTA TGA CCC TCA-3' (3495-3515)
CnrF: 5'-GTT TAC TTC TRA TCC (CT)GA ATC-3' (4031-4011)

Im Anschluss an eine Optimierungsphase wurden die Primer für die PCR und Sequenzierung aller Patientenproben für die RNase H und Connection Domain kombiniert. Folgende Primer wurden verwendet:

- 1. PCR** (Primer-Kombination 1): CnA₂, RNase B
- 2. (nested) PCR** (Primer-Kombination 2): CnC₂, RNase D

In wenigen Fällen (5 aller 57 Sequenzen) wurden die Primer-Kombinationen 3-7 verwendet, um durch kleinere Sequenzabschnitte den gesamten Sequenzbereich überlappend abzudecken.

4.2.2 Primer Design

Die Primer für die RNase H-Region (1) wurden von der Gruppe Roquebert et al. (2007) übernommen, jene für die Connection Domain (2) anhand der 690 Sequenzen aus der LANL-Datenbank mithilfe des Primalign Tools ausgewählt. Die Auswahl erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Eine Vielzahl der HIV-1 Subtypen sollte erreicht werden; deshalb wurden für die Connection Domain Alternativsequenzen bestellt (siehe Sequenzen in Material, 4.2.1), die an kritischen Stellen eine Wobble-Base enthalten.
- Es wurde darauf geachtet, dass CG-Bindungen, die aufgrund ihrer H₂-Brücken stabiler sind, mindestens 50% aller Basen der Sequenz ausmachen.
- Die Schmelztemperaturen sollten zwischen 50° C und 60° C liegen und innerhalb eines Primer-Paares nicht um mehr als 10° C differieren (siehe Tabelle 6).

Da auch nach Kombination der Primer beider Regionen eine Lücke von ca. 100 bp zwischen CN und RNase H bestand, wurden weitere zwei Primer entwickelt, die eine Überlappung zwischen diesen beiden Regionen ermöglichen: *cnrE*, *cnrF* (siehe Sequenzen in Material, 4.2.1). Diese wurden zum Teil im Rahmen der zweiten PCR eingesetzt, auf jeden Fall aber bei der Sequenzierung aller Patientenproben.

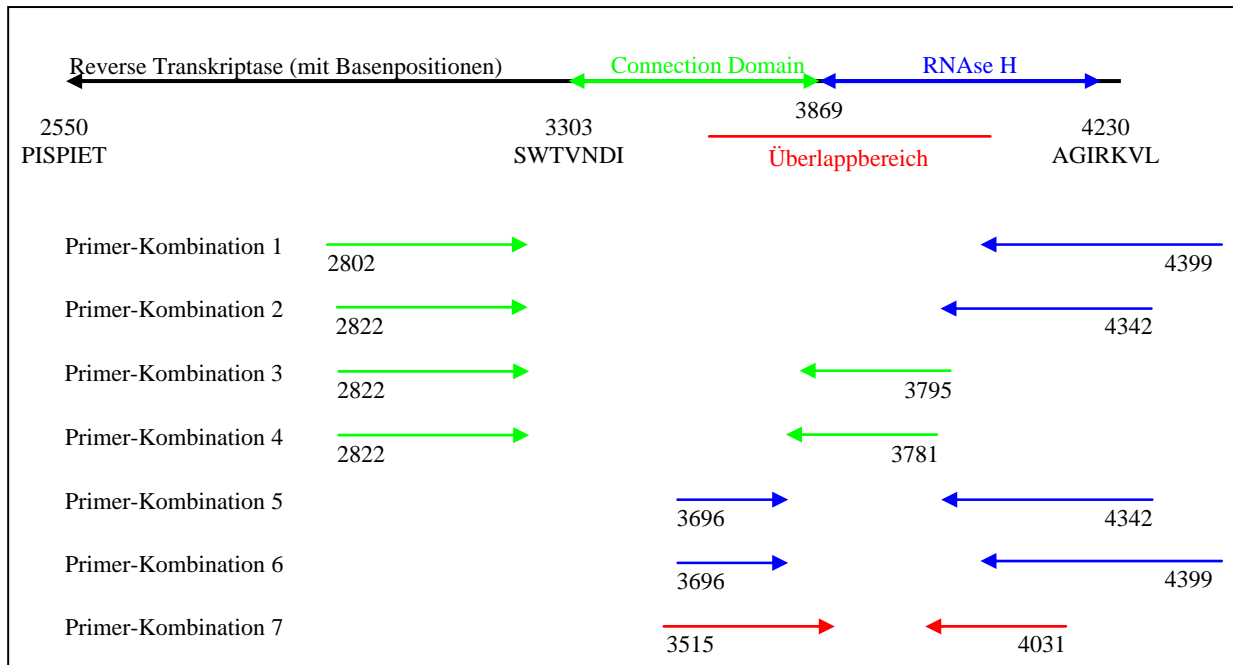


Abb. 7: Länge von Reverser Transkriptase, Connection Domain und RNase H-Domäne in Basen (anhand der HXB2-Sequenz) sowie verschiedene Primer-Kombinationen mit Startpunkt und Schreibrichtung; PISPIET, SWTVNDI und AGIRKVL geben die an den jeweiligen Basenpositionen umgeschriebenen Aminosäuren wieder.

Primer	Schmelztemperatur [°C]
RNase A	53,2
RNase B	55,3
RNase C	55,3
RNase D	51,1
CnA ₁	55,6
CnA ₂	54,5
CnB	55,6
CnC ₁	51,4
CnC ₂	52,5
CnD ₁	56,4
CnD ₂	57,1
<i>cnrE</i>	55,0
<i>cnrF</i>	54,0

Tab. 6: Die Schmelztemperaturen einzelner Primer

4.2.3 Extraktion

Um die RNA der ausgewählten Patienten in cDNA umschreiben zu können, wurde das Erbgut zunächst aus Serum bzw. Plasma extrahiert. Dazu wurden die Materialien des High Pure Viral Nucleic Acid Kits der Firma Roche verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3).

Das Virus wird zunächst im Lysepuffer (aus dem o.g. Kit, siehe Abschnitt 4.1.3) inkubiert, bis es lysiert. Die Zugabe von Proteinase K verstärkt diesen Prozess. In der Präsenz eines chaotropen Salzes binden die Nukleinsäuren spezifisch an eine Glas-Fiber-Oberfläche, während sich die organisierte Wassermolekülstruktur auflöst. In mehreren Waschschrritten werden die Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen Verunreinigungen gesäubert. Letztendlich erfolgt eine Lösung in einem Salz-Puffer bzw. Wasser.

Für 10 Proben wurden in folgender Reihenfolge Mengen verwendet:

- Pro Probe wurden 50µl Elutionspuffer gerechnet und auf 72° C vorgeheizt.
- Eine Arbeitslösung wurde frisch hergestellt, diese diente der Lyse.
- 50µl Poly A Carrier RNA, die in 0,5ml Elutionspuffer gelöst und in 50µl-Portionen bei -20°C gelagert wurde, wurde aufgetaut.
- 2,5ml Bindepuffer wurden hinzugefügt.
- In jedes der 10 Extraktionsgefäße wurden 400µl Arbeitslösung pipettiert.
- 500µl RNA-haltigen Materials (Serum oder Plasma) wurden hinzugefügt. Das Material wurde gut durchgemischt, allerdings nur bis 1,5 kb Ampliconlänge mittels Vortex, da die Fragmentierung darüber hinaus zu Sensibilitätsverlusten führen würde.
- In jedes Probengefäß wurden jeweils 100µl der vorbereiteten Proteinase K gegeben (Vorbereitung: Proteinase K wurde in 5ml Elutionspuffer in 510µl Portionen aufgelöst, Lagerung bei -20°C). Erneut wurde gevortext.
- 10 Minuten wurde bei 72°C inkubiert.
- Ca. 3 Sekunden wurde anzentrifugiert (siehe Material, 4.1.1).
- Im Anschluss wurden jeweils 200µl Binding Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert (bis ca. 2000 U/min)
- Für jede Probe wurde ein High Pure Filter Tube in ein dazugehöriges Auffanggefäß eingesetzt, in welches nun jeweils 500-600µl des Ansatzes der Patienten-RNA einpipettiert wurden.
- Erneut wurde zentrifugiert bei 8000 U/min, 1 Minute.
- Der Durchlauf wurde verworfen, der Filter in ein neues Gefäß gesetzt.
- Jeweils wurden 500 µl Inhibitor-removal-Puffer in das obere Reservoir pipettiert und erneut bei 8000 U/min eine Minute zentrifugiert.
- Wiederum wurde der Durchlauf verworfen.
- 450 µl Waschpuffer wurde hinzugeben und bei 8000 U/min eine Minute zentrifugiert.
- Der Waschgang wurde wiederholt und erneut bei 14.000 U/min Minute zentrifugiert.
- Nochmals wurde bei 14.000 U/min zentrifugiert, allerdings in einem neuen Auffanggefäß.
- Der jeweilige Filter-Tube wurde nun in ein nucleasefreies 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß eingesetzt.
- 50 µl Elutionspuffer wurden in jeden Filter-Tube geben, eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert.
- Die isolierte RNA musste nun linearisiert werden, die Probengefäße wurden 10 Minuten in 65° C erhitzt und damit denaturiert. Bis zur Umschreibung in cDNA, die bestenfalls im direkten Anschluss erfolgen sollte, wurde die RNA bei -20° C gelagert werden.

4.2.4 Reverse Transkription

Damit das virale Erbgut von HIV in einem späteren Schritt mithilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert und sichtbar gemacht werden kann, muss zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Der Schritt der reversen Transkription imitiert den natürlichen Ablauf, der sich bei der Genom-Replikation eines Retrovirus in einer infizierten Zelle abspielt; es wird also RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben.

Für eine Probe werden die folgenden Bestandteile benötigt (Reverse Transkription Ansatz, siehe Abschnitt 4.1.3, SuperscriptTM II, RNase H Reverse Transkriptase Kit): 4 µl 5x-Puffer, 2 µl DTT (0,1M), 2 µl dNTP (5 mM), 2 µl 3'-Primer (10µM) sowie 0,2 µl Superscript (Enzym, Reverse Transkriptase). Alle Bestandteile sollten zuvor und im Anschluss bei -20°C gelagert werden. Als Primer wurde RNase B als 3'-Primer verwendet, der am 3'-Ende der Reversen Transkriptase entlang der Plusstrang-RNA „zurückschreibt“ und stets in der ersten PCR verwendet wurde.

10 µl dieses Mixes wurden mit 10 µl der extrahierten Patienten-RNA in einem neuen Eppendorfgefäß gemischt und bei 45° C in einem Brutschrank für 60 Minuten inkubiert. Die hier umgeschriebene DNA (20 µl) wurde im nächsten Schritt, der PCR, in die Proben eingesetzt, im Rahmen der PCR amplifiziert und im Anschluss daran sichtbar gemacht.

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf den drei Schritten Denaturation, Annealing und Elongation. Sie dient dazu, DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und eine ausreichende Menge zu erhalten, so dass das Sequenzieren überhaupt möglich wird. RNA selbst ist dazu ungeeignet. Die verwendete Taq-Polymerase ist thermostabil. Typischerweise werden 30 Zyklen durchlaufen, in denen die folgenden Schritte mehrfach wiederholt werden:

- Zunächst wird die DNA bei 90° C denaturiert.
- Im nächsten Prozessschritt (annealing) lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Die Temperatur liegt bei 55°C, in Anlehnung an die Schmelztemperatur der zugefügten Primer.
- Schließlich folgt die Polymerisation. Die dNTPs werden als Bausteine mithilfe der Taq-Polymerase eingesetzt. Die Temperaturen für diesen Schritt liegen je nach Taq zwischen 68° C und 72° C.

In jedem Zyklus findet im Idealfall eine Verdoppelung der Ausgangsstränge statt. Letztendlich wird eine 10⁵-10⁹-fache Vermehrung des Ausgangsmaterials erreicht. Folgende Zutaten werden benötigt:

- DNA mit dem zu amplifizierenden Sequenzbereich (siehe Abschnitt 4.1.5),
- zwei Primer, die komplementär zu den DNA-Einzelsträngen gebunden werden. Für die komplette Region Connection und RNase H-Domain:
 1. PCR: Primer CnA₂ und RNase B,
 2. (nested) PCR: CnC₂ und RNase D,
- Taq Polymerase (siehe Abschnitt 4.1.3, je nach Sequenzlänge Taq 1 (GE Healthcare) oder Taq 2 (Roche Applied Biosystems)),
- dNTPs als Bausteine,
- MgCl₂-Ionen (häufig im Puffergemisch bereits vorhanden) sowie
- Pufferlösung als chemisches Milieu (je nach Sequenzlänge und Taq Polymerase).

Es wurden drei verschiedene PCR-Programme verwendet. Um die Primer für beide Regionen zunächst separat zu testen, wurde anfangs mit HIV-Standard-RNA (Gruppe M, Subtyp B, Isolatname: MvP 899) in verschiedenen Konzentrationen gearbeitet (10^{-9} - 10^{-2}). Da sowohl die Connection als auch die RNase H-Domain eine Sequenzlänge von 1000 bp nicht überschreiten, wurden für beide Regionen erste und zweite (nested) PCR mit dem zweiten Resistenzprogramm amplifiziert.

a) Erstes PCR-Programm: bei einer Sequenzlänge von ca. 700 bp.

1. PCR, Zusammensetzung für eine Probe:

- Aqua dest.: 20 μ l
- dNTP (1,25 mM): 8 μ l
- Puffer (siehe Abschnitt 4.1.3, GE Healthcare): 5 μ l
- Primer für die Minusstrangsynthese (RNase A bzw. CnA₁/CnA₂, 10 pmol/ μ l): 5 μ l
- Primer für die Plusstrangsynthese (RNase B bzw. CnB, 10 pmol/ μ l): 5 μ l
- Taq Polymerase (siehe Abschnitt 4.1.3, (1)): 0,4 μ l

Zu diesen 43 μ l wurden 7 μ l der frisch umgeschriebenen HIV cDNA gegeben. Die erste PCR wurde in diesem Programm gestartet, das 30 Zyklen gemäß Tabelle 7 umfasst.

2. (nested) PCR, Zusammensetzung für eine Probe:

- Aqua dest.: 25 μ l
- dNTP (1,25 mM): 8 μ l
- Puffer (siehe Abschnitt 4.1.3, GE Healthcare): 5 μ l
- Primer für die Minusstrangsynthese (RNase A bzw. CnA₁/CnA₂, 10 pmol/ μ l): 5 μ l
- Primer für die Plusstrangsynthese (RNase B bzw. CnB, 10 pmol/ μ l): 5 μ l
- Taq Polymerase (siehe Abschnitt 4.1.3, GE Healthcare): 0,4 μ l

Zu diesen 48 μ l wurden 2 μ l des Amplifikats aus der ersten PCR gegeben, und damit wurde die PCR im selben Programm erneut gestartet. Die Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf 2%-igem Gel, bei 85 V und 250 mA, 48 Minuten kontrolliert. Marker VIII wurde zur Bestimmung der Amplifikatlänge auf den äußeren Spuren mitgeführt (Struktur siehe Abbildung 13). Die sensitivsten Ergebnisse wurden bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} erzielt. Um eine Sensitivität von 10^{-7} bzw. 10^{-8} zu erlangen, wurden zwei Parameter der PCR variiert: die MgCl₂Konzentration und die Schmelztemperatur.

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeitdauer
Denaturierung	92	5 Minuten (nur erster Zyklus), 1 Minute
Annealing	55	30 Sekunden
Polymerisation	72	90 Sekunden, 7 Minuten (nur letzter Zyklus)
Cooling	4	unbegrenzt

Tab. 7: Ein Zyklus des ersten PCR-Programms

(i) Modifizierung der $MgCl_2$ -Konzentration

$MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,5 mM, 2,0 mM, 3,0 mM und 4,5 mM wurden hinzugefügt. Eine $MgCl_2$ -Konzentration von 3,0 mM bei ansonsten unveränderten Bedingungen ermöglichte Resultate bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} (siehe Abbildungen 8 und 9).

(ii) Veränderung der Schmelztemperatur im Cycler-Programm

Unter den o.g. Bedingungen lief die Reaktion parallel bei $50^\circ C$, $52^\circ C$ und $54^\circ C$ ab. Ergebnis: Eine geringfügig höhere Sensitivität wurde bei der Kombination 3,0 mM $MgCl_2$ und $52^\circ C$ Schmelztemperatur gegenüber 1,5 mM $MgCl_2$ und $50^\circ C$ beobachtet. Für das weitere Vorgehen wurde entschieden, 3,0 mM $MgCl_2$ und $50^\circ C$ Schmelztemperatur als Standard festzulegen (siehe Abbildungen 10 bis 12).

Für die komplette Region der Connection und RNase H-Domain wurde die beste Primer-Kombination verwendet: cnA_2 , CnC_2 und CnD_1 .

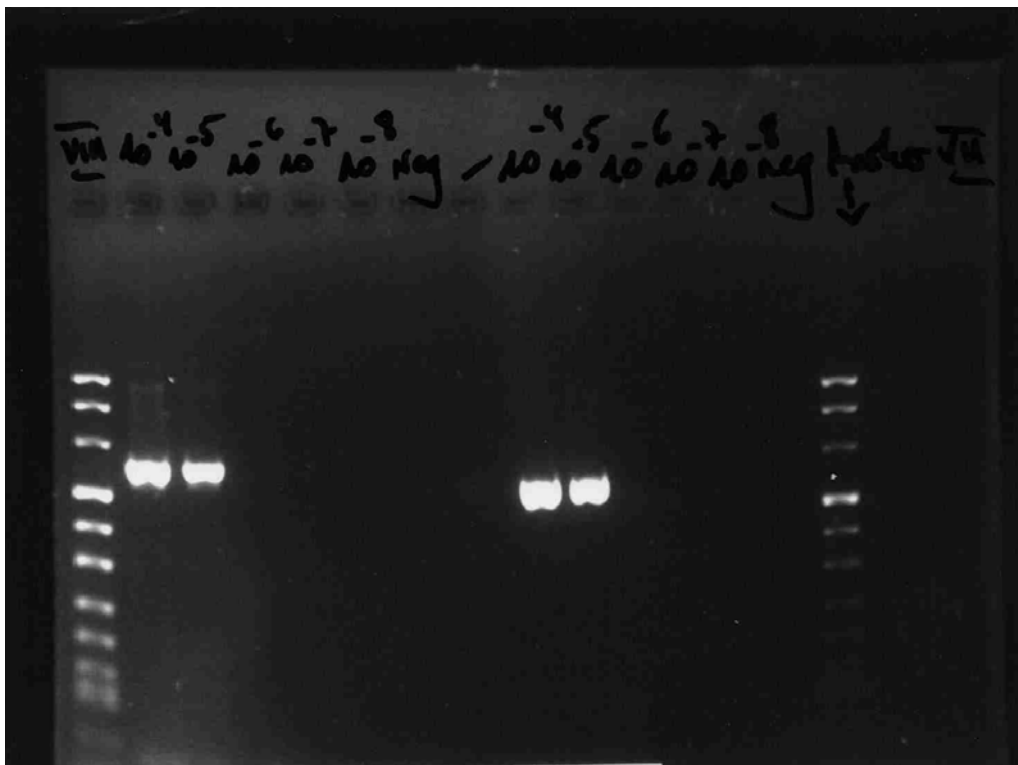


Abb. 8: Positionen 1 und 14: Marker VIII;
Position 2: 899×10^{-4} ; Position 3: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 1,5 mM;
Position 8: 899×10^{-4} ; Position 9: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 2,0 mM

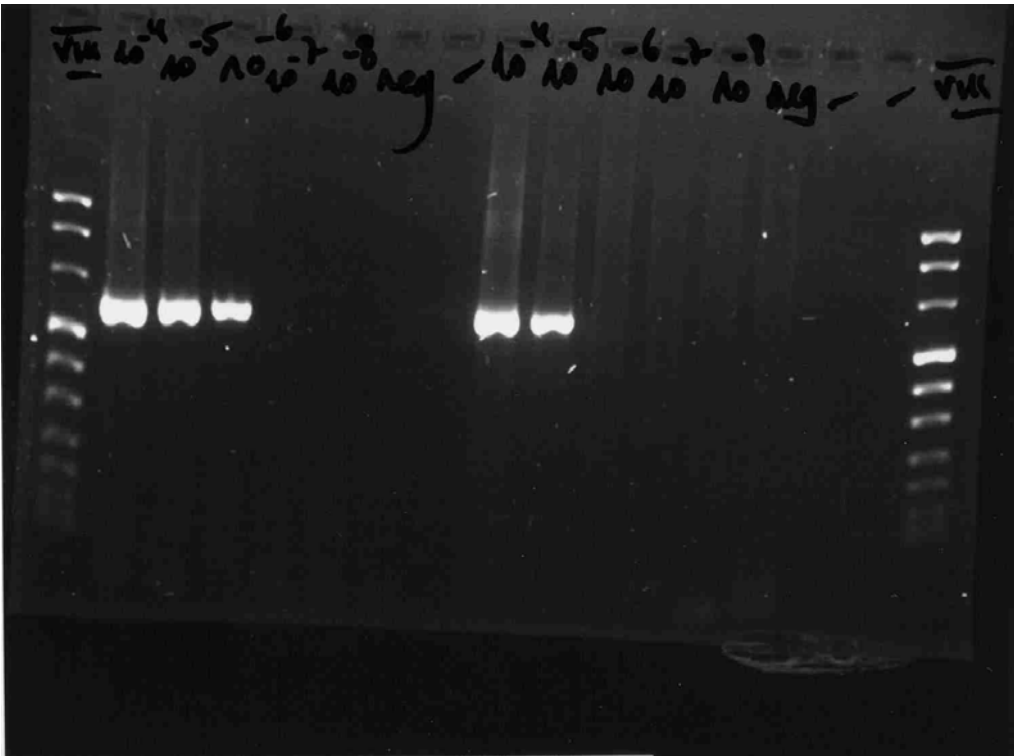


Abb. 9: Positionen 1 und 17: Marker VIII; Position 2: 899×10^{-4} ; Position 3: 899×10^{-5} ; Position 4: 899×10^{-6} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 3,0 mM; Position 10: 899×10^{-4} ; Position 11: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 4,5 mM

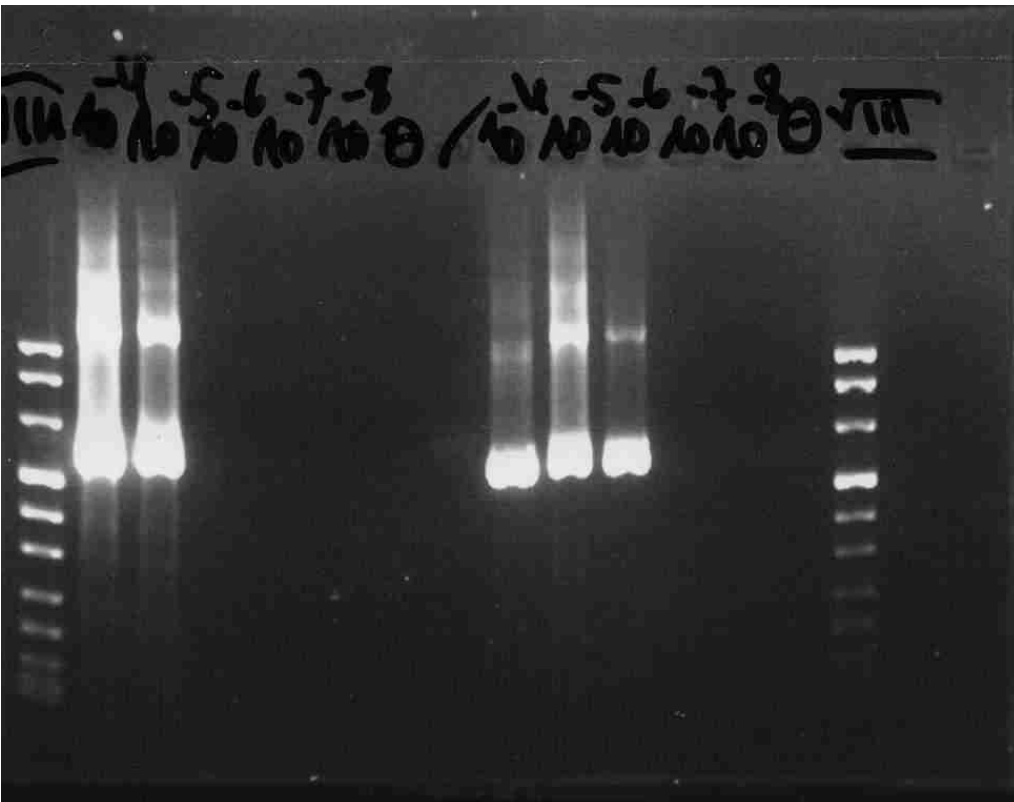


Abb. 10: Positionen 1 und 16: Marker VIII; Position 2: 899×10^{-4} ; Position 3: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 1,5 mM; Position 9: 899×10^{-4} ; Position 10: 899×10^{-5} ; Position 11: 899×10^{-6} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 3,0 mM, Schmelztemperatur: $50^\circ C$

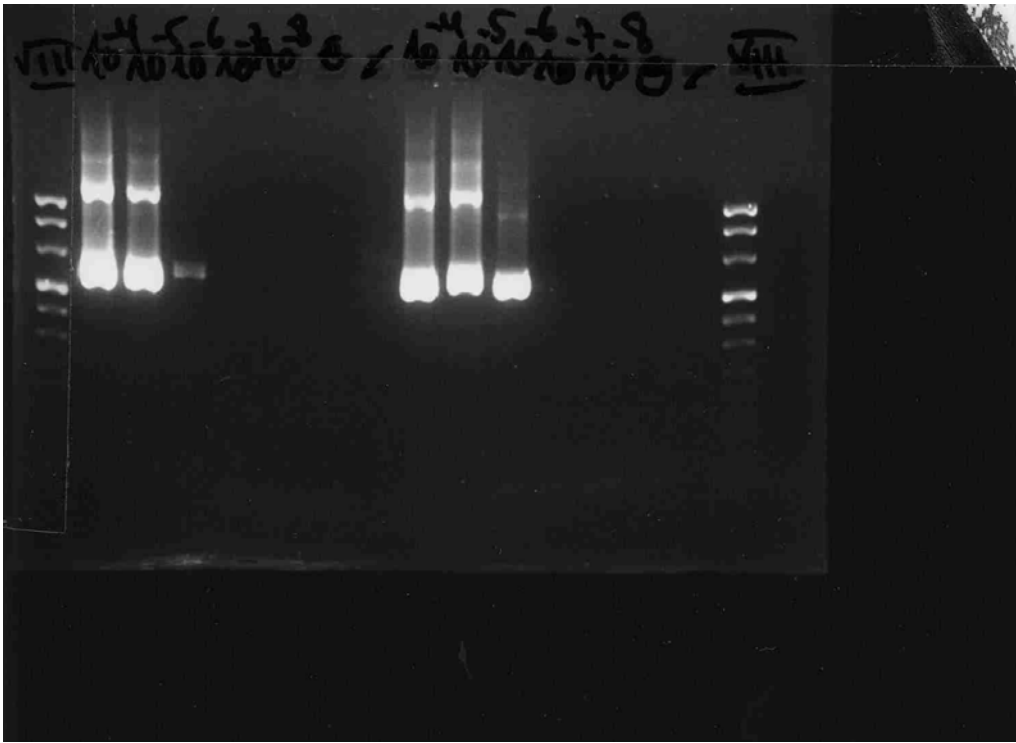


Abb. 11: Positionen 1 und 16: Marker VIII; Position 2: 899×10^{-4} ; Position 3: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 1,5 mM; Position 9: 899×10^{-4} ; Position 10: 899×10^{-5} ; Position 11: 899×10^{-6} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 3,0 mM, Schmelztemperatur: $52^\circ C$



Abb. 12: Positionen 1 und 17: Marker VIII; Position 2: 899×10^{-4} ; Position 3: 899×10^{-5} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 1,5 mM; Position 9: 899×10^{-4} ; Position 10: 899×10^{-5} ; Position 11: 899×10^{-6} ; $MgCl_2$ -Konzentration: 3,0 mM, Schmelztemperatur: $54^\circ C$

b) Zweites PCR-Programm: bei einer gesuchten Sequenz von ca. 1500 bp.

Die beiden Regionen Connection und RNase H-Domain sollten in einem Stück amplifiziert und sequenziert werden. Da die gewünschte Sequenz einer Länge von 1500bp entspricht, wurden erste und nested PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. PCR, Zusammensetzung für eine Probe:

- Aqua dest.: 17 µl
- Puffer (siehe Abschnitt 4.1.3, Roche Applied Biosystems): 5 µl
- Primer für die Minusstrangsynthese (CnA₂): 2 µl
- Primer für die Plusstrangsynthese (RNase B): 2 µl
- Taq Polymerase (siehe Abschnitt 4.1.3, (2)): 0,75 µl
- dNTP (1,25 mM): 14 µl

Diese 40 µl wurden mit jeweils 10 µl RNA gemischt. Die erste PCR wurde in diesem Programm gestartet, das 30 Zyklen gemäß Tabelle 8 umfasst. Diese Methode wurde für die erste PCR aller Patientenproben verwendet.

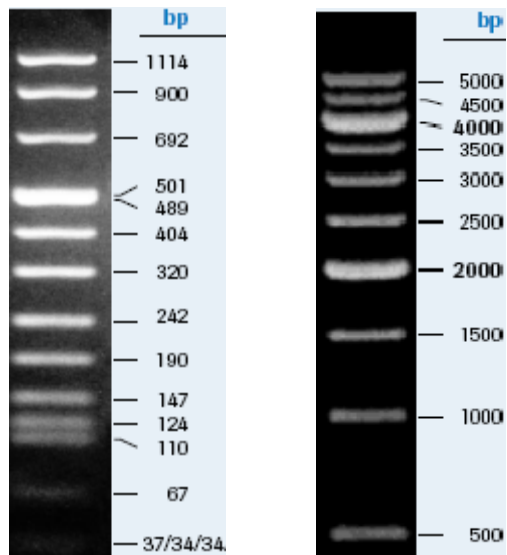


Abb. 13: DNA-Fragmente des Molecular Weight Markers VIII (links) und des Molecular Weight Markers XVII (rechts, jeweils Roche Applied Science, Mannheim)

Zyklen	Temperatur [° C]	Zeitdauer
Denaturation	92	2 Minuten, 10 Sekunden (10x)
Annealing	50	30 Sekunden (10x)
Elongation	68	2 Minuten (10x)
Denaturation	92	10 Sekunden (20x)
Annealing	50	30 Sekunden (20x)
Elongation	68	2 Minuten (20x)
Elongation	68	7 Minuten
Cooling	4	unbegrenzt

Tab. 8: Ein Zyklus des zweiten PCR-Programms

2. (nested) PCR, Zusammensetzung für eine Probe:

- Aqua dest.: 25 µl
- Puffer (siehe Abschnitt 4.1.3, Roche Applied Biosystems): 5 µl
- Primer für die Minusstrangsynthese (CnC₂): 2 µl
- Primer für die Plusstrangsynthese (RNase D): 2 µl
- Taq Polymerase (siehe Abschnitt 4.1.3, (2)): 0,75 µl
- dNTP (1,25mM): 14 µl

Funktionierte diese Primerkombination für die nested PCR nicht, was bei einem Achtel der Patienten der Fall war, so wurde die zweite PCR, aufgeteilt in folgende Kombinationen, unter denselben Bedingungen durchgeführt (siehe Anhang A.1):

Primer Kombination 2: CnC₂, RNase D

Primer Kombination 3: CnC₂, cnB

Primer Kombination 4: CnA₂, cnD₁

Weiterhin unter den unter a) genannten Bedingungen für kürzere Sequenzen:

Primer Kombination 5: RNase A, RNase D

Primer Kombination 6: RNase A, RNase B

Primer Kombination 7: cnrE, cnrF

Zu diesem 48 µl-Mix wurden jeweils 2 µl des Amplifikats der ersten PCR gemischt und die nested PCR im o.g. Programm gestartet. Es folgte eine Gelelektrophorese auf 1%-igem Gel, bei 75 V und 250 mA, 75 Minuten. Marker XVII wurde zur Bestimmung der Amplifikatlänge auf den äußeren Spuren mitgeführt (Struktur siehe Abbildung 13). Weder für die erste noch für die zweite PCR wurden Schmelztemperatur oder MgCl₂-Konzentration variiert.

c) Drittes PCR-Programm: Hot Start PCR, ebenfalls bei einer gewünschten Sequenz von ca. 1500 bp, eingesetzt zum Vergleich mit dem zweiten PCR-Programm.

Diese Methode wurde einmalig angewandt, um unspezifische Reaktionen im Rahmen der PCR zu verhindern; die Taq Gold ist erst ab sehr hohen Temperaturen aktiv, während andere Polymerasen bereits bei Raumtemperatur reagieren können. Grund für die Anwendung dieser Methode war eine Sequenz von ca. 100 Basenpaaren, die zwischen Connection und RNase H-Domain fehlte. Es wurde versucht, diesen Bereich durch Kombination der Primer beider Regionen zu überbrücken.

1. PCR: Zusammensetzung für eine Probe wie im zweiten PCR-Programm.

2. PCR, Zusammensetzung für eine Probe:

- Aqua dest.: 23,75 µl
- Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM MgCl₂ (N808-0010 oder N808-0130)): 4 µl
- MgCl₂ (25 mM): 4 µl
- dNTP 5(mM): 2 µl
- Primer für die Minusstrangsynthese (CnC₂): 2 µl
- Primer für die Plusstrangsynthese (RNase D bzw. CnB): 2 µl
- Taq Gold: 0,25 µl

Das dritte PCR-Programm für diesen PCR-Mix umfasst 40 Zyklen; die Bedingungen sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Gelelektrophorese erfolgte auf 1%-igem Gel bei 75 V, 250 mA, für 75 Minuten. Die Methode erwies sich als nicht erfolgreich und wurde nicht mehr angewandt. Letztendlich wurde die erste PCR für alle Patientensequenzen nach dem zweiten PCR-Programm mit den Primern cnA₂ und RNase B durchgeführt. Es wurden weder die MgCl₂-Konzentration noch die Schmelztemperatur verändert. Auch die zweite (nested) PCR erfolgte für den Großteil der Proben nach dem zweiten PCR-Programm, hier mit den Primern cnC₂ und RNase D. Für eine Minderheit der Proben musste jene Variante eingesetzt werden, die sich aus fünf Primer-Kombinationen (siehe Abschnitt 4.1.2, Text und Abbildung 7) zusammensetzte.

4.2.6 Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden 8 µl der PCR-Produkte in die Taschen des Gels eingebracht und die Länge der jeweiligen DNA-Stücke anhand ihrer Laufgeschwindigkeit bestimmt.

Im Anschluss an die nested PCR erfolgte grundsätzlich die Gelelektrophorese, durch welche es möglich war, die amplifizierten DNA-Sequenzen zu sehen.

Das eingesetzte Agarose-Gel bestand aus folgenden Komponenten. Sie genügen für mindestens zwei Gele, die 1%-ig oder 2%-ig sein sollen, und eignen sich für DNA-Stücke, die eine Länge über bzw. bis zu 1000 bp aufweisen:

- 100 ml TBE (Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), Borsäure (Merck, Molekulargewicht: 61,83 g/mol), EDTA (Merck, Katalog-Nr. 324503) – im Verhältnis: in 5 l: Tris: 60,6 g, Borsäure: 30,9 g, EDTA: 3,7 g)
- 1%-iges oder 2%iges Agarose-Gel
- 1,5 µl Ethidiumbromid

Nachdem die Gele polymerisiert waren, wurde flüssiges TBE hinzugegeben, um das Gel vor Austrocknung zu bewahren. In die erste Tasche wurden je nach Sequenzlänge 10 µl eines Markers (VIII oder XVII) pipettiert, welcher leiterartig (siehe Abschnitt 4.2.5) DNA-Fragmente bekannter Länge enthält und somit als Orientierung hinsichtlich der Länge der eigenen Produkte diente.

- Marker VIII (für Sequenzlängen bis 1000 bp, siehe Abschnitt 4.1.3)
- Marker XVII (für Sequenzlängen über 1000 bp, siehe Abschnitt 4.1.3)

8 µl der PCR-Produkte der nested PCR wurden mit 2 µl Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese lief je nach Sequenzlänge 30 bis 75 Minuten:

- 2%-ige Gele mit Sequenzlängen von ca. 700 bp liefen am erfolgreichsten 48 Minuten, bei 250 mA und 85 V,
- 1%-ige Gele mit Sequenzlängen von 1500bp 75 Minuten, bei 250mA und 75V.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden das Gel photographiert und die Resultate ausgewertet.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeitdauer
Denaturation	95	5 Minuten, 30 Sekunden (40x)
Annealing	55	45 Sekunden (40x)
Elongation	72	1 Minute (40x)
Elongation	72	7 Minuten
Cooling	4	unbegrenzt

Tab. 9: Ein Zyklus des dritten PCR-Programms

4.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung lässt sich grob in vier Abschnitte unterteilen: erste Fällung, Sequenzreaktion, zweite Fällung und Kapillar-Elektrophorese mit Detektion.

a) Erste Fällung

Aus den Produkten der zweiten (nested) PCR der Patientenproben wurden im ersten Schritt Eluate hergestellt. Vorbereitung: Herstellung 70%-igen Alkohols aus Ampuwa und absolutem Alkohol. Es wurden die Materialien und Reagenzien von Agencourt[®] verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3).

- Die Proben wurden in die Reaktionsplatte (Thermowell[®] Well Platte) gegeben.
- Magnetic Particle Soluten (40 µl bzw. das 1,8-fache der jeweiligen Probenmenge) wurde in jedes Well gegeben und bis zur Homogenität gemischt.
- 5 Minuten wurde inkubiert, anschließend wurde erneut 10 Minuten auf der Magnetplatte inkubiert.
- Die klare Flüssigkeit wurde abpipettiert.
- An der Wand hängengebliebene MGPs wurden folgendermaßen gewaschen:
 - 200 µl 70%-igen Ethanol wurden in jedes Well zugegeben und 60 Sekunden inkubiert,
 - Flüssigkeit wurde abpipettiert,
 - der Waschschrift wurde wiederholt.
- Die Reaktionsplatte wurde von der Magnetplatte entfernt und 15 Minuten getrocknet.
- Elutionsbuffer (Aqua ad iniectabilia), 40 µl pro Probe, wurde hinzugefügt.
- Erneut wurde 3 Minuten auf der Magnetplatte inkubiert.
- Das Eluat wurde aus den Wells in jeweils ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß abpipettiert.

Bevor die Sequenzreaktion gestartet wurde, wurden die Eluate nochmals mittels Gelelektrophorese kontrolliert. In Abhängigkeit von der Ausprägung ihrer Banden (hinsichtlich Intensität) wurde dann entschieden, in welchem Verhältnis Eluat bzw. DNA zu Aqua dest. in den Sequenzmix zu geben war.

b) Sequenzreaktion

Alle Reagenzien sind auf einem Kühlblock aufzubewahren. Es wurden die Reagenzien von Beckman Coulter[®] verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3). Pro Probe wurden acht verschiedene Primer, d.h. acht 0,2 ml fassende Eppendorfgefäße benötigt. In jedes Gefäß wurde in folgender Reihenfolge pipettiert:

- Aqua dest.: je nach Menge des hinzugegebenen Eluats zwischen 0,5 und 5 µl
- Eluat (DNA): 0,5-5 µl je nach Bandenstärke, mit Aqua dest. auf 5,5 µl aufgefüllt;
Primer (pro Gefäß jeweils einer von RNase A, RNase D, cnA₂, cnD₁, CnC₂, CnB, CnrE, cnrF) in 5 pmol/µl: 0,5 µl
- DTCS Quick Start Master Mix: 4 µl

Anschließend wurden die Proben an zentrifugiert (ca. 3 Sekunden). Die Sequenzreaktion startete unter den in Tabelle 10 genannten Bedingungen bei 30 Zyklen. Die Heizdeckeltemperatur betrug 150° C.

c) Zweite Fällung

Die zweite Fällung erfolgte bald nach der Sequenzreaktion. Dazu wurde 85%-iger Alkohol vorbereitet. Es wurden die Materialien und Reagenzien von Agencourt[®] und Beckman Coulter[®] verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3).

- 10 µl der Sequenzreaktions-Proben wurden in die Wells der Thermowell[®] 96 Well Plate übertragen.
- 10 µl der Magnetic Particle Solution wurden zu jeder Probe hinzugefügt und sofort gemischt
- 42 µl 85%-igen Ethanol wurden hinzugemischt.
- 3 Minuten wurde auf der SPIRIPlate96R Magnetplatte inkubiert.
- Ethanol wurde abpipettiert, die MGPs blieben als Ring an den Wänden der Wells unverändert.
- 100 µl 85%-igen Ethanol wurde erneut hinzugefügt. Es wurde 60 Sekunden inkubiert.
- Das Ethanol wurde abpipettiert. Es wurde für 10 Minuten auf dem Tisch trocknen gelassen.
- 40µl im Dunkeln aufgetaute Sample Loading Solution (SLS) wurde hinzugefügt. 7 Minuten wurde auf einem Schüttler gemischt (abgedeckt wegen der lichtempfindlichen SLS).
- 3 Minuten ruhte die Reaktionsplatte auf mit Papier abgedeckter Magnetplatte, die Magnetkügelchen sammelten sich am Boden der Wells.
- In jedes Well wurde ein Tropfen Mineral Oil gefügt.
- Neben der Reaktionsplatte wurde eine 96 Well EIA/RIA Plate vorbereitet, in welche in den entsprechenden Wells Separation Buffer gefügt wurde.
- Beide Platten wurden mit je nach Reihenanzahl entsprechender Gel-Menge und wetting trays in das Sequenzgerät eingesetzt.

Die Testeinstellungen, bei denen sequenziert wurde, sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeitdauer
Denaturation	96	60 Sekunden
Annealing	50	60 Sekunden
Elongation	60	60 Sekunden
Cooling	4	unbegrenzt

Tab. 10: Sequenzreaktionsbedingungen

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Spannung [kV]	Zeitdauer
Kapillare	50		
Denaturation	90		120 Sekunden
Injektion		2	15 Sekunden
Separation		4,2	85 Minuten
Pause			0 Minuten

Tab. 11: Testeinstellungen der Sequenz-Detektion (Methode: LFR-1)

4.2.8 Auswertung

Die Analyse der Sequenzrohdaten erfolgte mithilfe der Programme Pregap und Gap4. Nachdem die Abfolge der Basen dadurch vorlag, wurden die Sequenzen in Aminosäuren umgeschrieben (Aminosäuren-Code siehe Anhang A.3).

Um Mutationen von natürlich vorkommenden Positionen unterscheiden zu können, erfolgte für alle Sequenzen ein Alignment im Bioedit Programm. Eine subtypenspezifische Referenzsequenz wurde den experimentell ermittelten Sequenzen gegenübergestellt und als Auswertungsgrundlage verwendet. Anhand dieses Alignments wurden für alle Patientensequenzen die Aminosäure-Positionen im Bereich der Connection und RNase H-Domain auf Mutationen untersucht. Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur (Nikolenko et al., 2004, 2005; Delviks-Frankenberry et al., 2007; Nikolenko et al., 2007; Brehm et al., 2007, 2008, sowie Roquebert et al., 2007) wurden die folgenden Positionen bevorzugt untersucht:

- im Bereich der Connection Domain: 312, 333, 335, 360, 365, 371
- im Bereich der RNase H: 469, 470, 509, 554, 558.

Weiterhin wurden diese beiden Sequenzbereiche der Reversen Transkriptase auf andere auffällige Positionen, die von der Referenz (der balancierten Consensus-Sequenz) abweichen, sowie an funktionell wichtigen Regionen (Primer Grip der RNase H und aktives Zentrum der RNase H) abgesucht.

5 Ergebnisse und Interpretation

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte nach Subtypen getrennt. 50 Sequenzen stammten von Patienten, die mit Subtyp B infiziert sind, 20 Patienten waren noch unbehandelt. Es wurden insgesamt von 28 behandelten Patienten Sequenzen erstellt und bewertet. Untersucht wurden zum einen jene Positionen in der Connection und RNase H-Domain, die in der Literatur als Schlüsselpositionen angesehen werden, und zum anderen weitere für die Enzymaktivität essentielle Positionen. Fünf Patientenproben sind dem Subtyp A zuzurechnen, zwei gehören weder A noch B an.

Die Sequenzen zweier behandelter Patienten des Subtyps B wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Therapie untersucht. Die Betrachtung der verschiedenen Sequenzen diente einerseits dazu, mögliche Unterschiede, die im Verlauf der Therapie aufgetreten und auf diese zurückzuführen sein könnten, festzustellen und zu analysieren. Andererseits lassen sich durch diese Doppelsequenzierung die angewandten Methoden hinsichtlich ihrer Qualität einordnen und validieren. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass die zwei Mutationen, die bei jeweils dem einen bzw. anderen Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Aminosäuren aufwiesen, vermutlich auf die Therapie zurückzuführen sind. Weitere Unterschiede, die auf Durchführungsfehler hindeuten könnten, wurden nicht gefunden. Die Methode erwies sich als fehlerfrei und reproduzierbar. Es wurden also insgesamt von 28 behandelten Patienten Sequenzen erstellt und bewertet.

In die statistische Bewertung der zweifach sequenzierten Proben geht beim Patientennummern-Paar 31406/03386 die Nummer 03386 ein, da diese Sequenz den behandelten bzw. mit relevanten Mutationen einhergehenden Zustand des Patienten wiedergibt. Vom Paar 35306/10695 geht in die Berechnung Nummer 35306 mit ein, da diese Sequenz eine Mutation unter NNRTI-Therapie aufweist, die zum Zeitpunkt der Sequenzerstellung 10695 nicht existierte (komplette Sequenzen: siehe Anhang A.2).

5.1 Subtyp B

5.1.1 Schlüsselpositionen in Connection und RNase H-Domain

Für die zu untersuchenden Schlüsselpositionen in Connection und RNase H-Domain ergab sich die Verteilung von Aminosäuren, wie sie Tabelle 12 zu entnehmen ist.

Die untersuchten Positionen liefern keinerlei statistisch signifikante Hinweise auf einen Therapieeinfluss bzw. einen Einfluss durch bestehende Resistenzmutationen auf Veränderungen in der Connection und RNase H-Domain. Vielmehr ist an den meisten Positionen (wie beispielsweise an Position 312) eine hohe Konservierung zu beobachten, die sowohl in der Referenzsequenz als auch in allen vier therapierten Untergruppen sowie in der Gruppe der unbehandelten Patienten auftritt. Andere Positionen (wie beispielsweise Position 376) zeigen einen hohen Polymorphismus, der sowohl in der Referenzsequenz als auch in den experimentell sequenzierten Gruppen nachzuweisen ist. Die in den Verteilungsmustern auftretenden Unterschiede zwischen Referenzsequenz und unbehandelten Patientenproben sind angesichts der geringen Probenanzahl statistisch nicht signifikant.

5.1.2 Weitere funktionell relevante Positionen

Neben den in der Literatur als bedeutsam erachteten Positionen wurden weitere Positionen untersucht, die von funktioneller Relevanz für die Enzymaktivität sind: solche im Primer Grip in der Connection Domain (Positionen 359, 360, 361, 390, 395, 396, 448, 473, 474, 475, 476, 500, 501, 505) und solche im aktiven Zentrum der RNase H-Domain (Positionen 443, 478, 498, 549). Nahezu alle diese Positionen zeigten eine äußerst hohe Konservierung der dort jeweils vorhandenen Aminosäure. Dies deutet auf die essentielle Bedeutung dieser Positionen

für eine korrekte Arbeitsweise dieser beiden Funktionseinheiten hin. Ausnahmen bilden Positionen 359 und 390. Bei Position 359 tritt zusätzlich zu wahrscheinlichem Therapieeinfluss ein offensichtlicher Subtypenunterschied auf: Bei Subtyp A ist regelmäßig die Aminosäure Serin, bei Subtyp B dagegen vorwiegend Glycin anzutreffen.

An fünf Positionen weisen die Aminosäure-Verteilungsmuster Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Patienten auf (siehe Tabelle 13). Diese Unterschiede zeigen an Positionen 359 und 558 eine klare statistische Signifikanz, während an Position 333, insbesondere unter NRTI-Therapie, sowie an den Positionen 371 und 390 eine schwache

Positionen	312	335	348	360	365	376	469	470	509	554
Consensus Subtyp B (aus 92 Sequenzen, siehe Abschnitt 4.1.6)	E 97%	G 95%	N 98% I 1%	A 87% T 13%	V 95% I 5%	A 69% T 25% S 4% V 2% F 0%	L 86% I 12%	T 74% N 10% A 8% P 6%	Q 96% K 1% L 1% H 1%	A 70% S 19% T 9% N 2%
Patientengruppen:										
<i>mit TAMs (20 Patienten)</i>	E 100%	G 95% S 5%	N 94% I 6%	A 83% T 17%	V 89% I 11%	A 79% T 11% S 11%	L 95% I 5%	T 63% N 21% A 5% P 5% R 5%	Q 85% K 5% L 5% H 5%	A 45% S 15% T 25% N 15%
<i>mit Mutationen im Finger-Bereich (24 Patienten)</i>	E 100%	G 96% S 4%	N 96% I 4%	A 82% T 18%	V 91% I 9%	A 82% T 9% S 9%	L 96% I 4%	T 70% N 17% A 4% P 4% R 4%	Q 88% K 4% L 4% H 4%	A 54% S 13% T 21% N 13%
<i>mit Mutationen unter NNRTI Therapie (22 Patienten)</i>	E 100%	G 95% S 5%	N 100%	A 85% T 15%	V 95% I 5%	A 75% T 10% S 15%	L 100%	T 81% N 9% P 5% A 5%	Q 91% L 5% H 5%	A 64% S 9% T 14% N 14%
<i>mit Mutationen an Position M184V (15 Patienten)</i>	E 100%	G 94% S 6%	(14 Pat) N 100%	(14 Pat) A 86% T 14%	V 93% I 7%	(14 Pat) A 64% T 7% S 14% V 14%	L 93% I 7%	(14 Pat) T 71% P 14% N 21%	Q 87% L 7% K 7%	A 47% S 13% T 20% N 20%
<i>unbehandelt (10 Patienten)</i>	E 100%	G 100%	N 100%	A 80% T 20%	V 90% I 10%	A 40% T 40% S 10% V 10%	L 100%	T 100%	Q 90% K 10%	A 22% S 33% T 22% N 22%

Tab. 12: Aminosäurefrequenzen von vier Behandeltegruppen und von unbehandelten Patienten aus dem Münchener Patientenkollektiv an Schlüsselpositionen der Connection und RNase H-Domain. Da Resistenzmechanismen häufig in Kombination vorkommen, gibt es Mehrfachnennungen. Unterschiede hinsichtlich der jeweiligen Anzahl der Patienten beruhen auf Sequenzierlücken für diese Positionen.

Positionen	333	359	371	390	558
Consensus Subtyp B (aus 92 Sequenzen, siehe Abschnitt 4.1.6)	G 88% E 10% D 1%	G 98% S 2%	A 97% V 2% I 0%	K 74% R 26%	K 95% R 5%
Patientengruppen :					
<i>mit TAMs</i> (20 Patienten)	G 84% E 16%	(16 Pat) G 63% S 38%	A 67% V 28% I 5%	K 45% R 56%	K 80% R 20%
<i>mit Mutationen im Finger-Bereich</i> (24 Patienten)	G 87% E 13%	(17 Pat) G 59% S 41%	A 71% V 24% I 5%	K 43% R 57%	K 78% R 22%
<i>mit Mutationen unter NNRTI Therapie</i> (22 Patienten)	G 81% E 19%	(20 Pat) G 65% S 35%	A 75% V 20% I 5%	K 35% R 65%	K 82% R 18%
<i>mit Mutationen an Position M184V</i>	(15 Pat) G 67% E 20% D 13%	G 64% S 36%	(14 Pat) A 64% V 29% I 7%	(14 Pat) K 40% R 54%	(15 Pat) K 94% R 7%
<i>Alle behandelten Patienten gesamt</i>	(27 Pat) G 82% E 15% (4) D 4% (1)	(26 Pat) G 65% (17) S 35% (9)	(26 Pat) A 73% (19) V 23% (6) I 4% (1)	(26 Pat) K 42% (11) R 58% (15)	(28 Pat) K 82% R 18% (5)
<i>Unbehandelte Patienten</i>	(10 Pat) G 100%	(10 Pat) G 100%	(17 Pat) A 94% V 6%	(10 Pat) K 70% R 30%	(20 Pat) K 90% (18) E 10% (2)
Signifikanz nach chi²					
<i>Behandelte Patienten gesamt gegenüber Unbehandelten</i>	p = 0,1434	p = 0,0394	p = 0,1220	p = 0,1366	p = 0,0576
<i>Für Position 333: M184V gegenüber Unbehandelten</i>	p = 0,0613				
<i>Referenzsequenz (92 Unbehandelte) gegenüber Behandelten (20-24 Patienten)</i>	p = 0,0367 (bei Vorliegen von M184V)	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,025	p = 0,0373

Tab. 13: Aminosäurefrequenzen von vier Behandeltegruppen und von unbehandelten Patienten aus dem Münchener Patientenkollektiv an weiteren ausgewählten Positionen der Connection und RNase H-Domain. Da Resistenzmechanismen häufig in Kombination vorkommen, gibt es Mehrfachnennungen. Unterschiede hinsichtlich der jeweiligen Anzahl der Patienten beruhen auf Sequenzierlücken für diese Positionen. Rotfärbung deutet auf Hinweise auf therapiespezifischen Einfluss.

statistische Signifikanz nachweisbar ist. Ein Therapieeinfluss auf das Aminosäurevorkommen darf an allen fünf Stellen vermutet werden. Die geringe Größe des untersuchten Kollektivs dürfte die schwachen statistischen Signifikanzen für Positionen 333, 371 und 390 erklären. Der Vergleich zwischen der unbehandelten Referenzsequenz und den behandelten Patienten dieses untersuchten Kollektivs zeigt für alle Positionen eine hohe statistische Signifikanz.

Als belegt gelten darf der Zusammenhang zwischen therapeutischer Behandlung und Mutationsfrequenz im Connection und RNase H-Domain-Bereich für Positionen 333 (bei Vorliegen von M184V), 359 und 558.

5.2 Subtyp A

Auch anhand der Gruppe von fünf Patientenproben, die dem Subtyp A zuzurechnen sind, lässt sich keinerlei Zusammenhang zwischen Therapie und Mutationen in der Connection und RNase H-Domain herstellen. Für statistisch belastbare Aussagen ist dieser Patientenpool allerdings zu klein.

5.3 Subtypenspezifika

Mit Hilfe der subtypenspezifisch generierten Consensus-Sequenzen wurden Subtypenspezifika untersucht, um mögliche Unterschiede bezüglich der natürlichen Aminosäuren-Verteilung darstellen und bewerten zu können. Dabei fanden sich Positionen, an denen zu 100% eine Übereinstimmung zwischen der Consensussequenz (ausschließlich unbehandelte Patienten) und dem beobachteten Patientenkollektiv (behandelte und unbehandelte Patienten) besteht. Diese Positionen zeigen regelmäßig Unterschiede zwischen Subtyp A und Subtyp B (siehe Tabelle 14 oben); diese Unterschiede hingen nicht mit Therapie zusammen (siehe Anhang A.2, Tabellen 1 und 2). Weiterhin wurden Positionen gefunden, an denen solche Subtypenunterschiede nur annähernd durch die experimentell gefundenen Ergebnisse bestätigt wurden (siehe Tabelle 14 unten sowie Anhang A.2, Tabellen 1 und 2).

5.4 Subtyp Non-A-Non-B

Auch die Sequenzen jener zwei Patienten, die weder Subtyp A noch Subtyp B angehören, weisen keinerlei therapieabhängige Mutationen in der Connection und RNase H-Domain auf.

Tab. 14: Gegenüberstellung von (unbehandelten) Consensus- sowie (behandelten und unbehandelten) Patientensequenzen an solchen Positionen, die unabhängig von Therapie subtypenspezifische Unterschiede aufweisen: bei 100%-iger Übereinstimmung (oben) und bei annähernder Übereinstimmung (unten) zwischen Consensus- und Patientensequenzen.

Positionen	291	292	471	534
Consensus Subtyp A	D	I	E	S
Consensus Subtyp B	E	V	D	A
Patientenpool Subtyp A	D	I	E	S
Patientenpool Subtyp B	E	V	D	A
Positionen	286	371	403	491
Consensus Subtyp A	A	V	M	S
Consensus Subtyp B	T	A	T	L
Patientenpool Subtyp A	A	V	M	S
Patientenpool Subtyp B	T	A	T	L

6 Diskussion

In diesem Abschnitt werden die gefundenen Ergebnisse der aktuellen Literatur gegenübergestellt und hinsichtlich der Fragestellung der Arbeit diskutiert (siehe Abschnitt 5).

6.1 Auftreten von Mutationen

In diesem Abschnitt wird bewertet, ob und inwiefern überhaupt Mutationen in der Connection und der RNase H-Domain auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurden In-vivo-Aminosäureaustausche im Vergleich zu einer Referenzsequenz gefunden. Dabei zeigt sich, dass diese Unterschiede in Abhängigkeit vom jeweiligen Subtyp differenziert zu bewerten sind; außerdem ist für den Vergleich eine Referenzsequenz speziell des jeweiligen Subtyps heranzuziehen. Eine solche strenge Subtypen-Trennung ist neu und wurde in der für diese Arbeit herangezogenen Literatur überwiegend vernachlässigt. Nur die Gruppe um Santos et al. (2008) hat einen ähnlichen Ansatz, der bei einer brasilianischen Patientengruppe verfolgt wurde. Ihre Ergebnisse sind daher am interessantesten für den direkten Vergleich.

Insgesamt stellt sich heraus, dass dadurch für die meisten in der Literatur genannten mutierten Positionen dieser Regionen kein Zusammenhang zu Therapiebehandlung hergestellt werden kann. Fünf Positionen hingegen, die jeweils in anderen Studien bereits beleuchtet wurden, lassen einen Einfluss durch Therapie vermuten.

6.1.1 Positionen mit hoher Konservierung

Aminosäurepolymorphismen treten an diversen Positionen der Connection und RNase H-Domain auf. Sie werden im Rahmen dieser Arbeit differenziert nach Subtypen bewertet.

Darüberhinaus wurden zahlreiche Positionen gefunden, die sowohl in der Referenzsequenz als auch in den Gruppen der behandelten und unbehandelten Patienten eine hohe Konservierung aufweisen. Dazu gehören besonders Positionen, die in funktionellen Zentren optimiert für den viralen Replikationszyklus sind (Primer Grip und aktives Zentrum der RNase H). In-vitro-Studien haben vielfach gezeigt, dass gezielte Punktmutationen von Aminosäuren dieser Zentren die virale Enzymkapazität (sowohl die Aktivität nur der RNase H als auch die der gesamten Reversen Transkriptase) und damit die Infektiosität des Virus drastisch senken. Dies zeigten Mutationen an Position H361 (Rausch et al., 2002; Julias et al., 2003), situiert im Primer Grip, und an Positionen H539 und D549 (Tisdale et al., 1991), letztere als Teil des aktiven Zentrums der RNase H. Die Mutationen H539N und D549N wurden von Nikolenko et al. hergestellt und auf ihren Zusammenhang mit Resistenzmutationen und damit einhergehender Resistenzsteigerung getestet und als auffällig befunden (Nikolenko et al., 2005). Sie zeigten allerdings weder in den In-vivo-Analysen von Roquebert et al. (2007) und Santos et al. (2008) noch in der vorliegenden Arbeit Auffälligkeiten. Dass diese Mutationen in vivo auftreten, ist zweifelhaft. Sie wurden bisher noch nie beobachtet.

Bereits 1991 wurde neben anderen Positionen auch Position H539N hinsichtlich der Relevanz der RNase H Funktion betrachtet (Tisdale et al., 1991). Dabei hatte sich gezeigt, dass das Ausschalten dieser Positionen zu einem Funktionsverlust der RNase H sowie der gesamten Reversen Transkriptase führt. In der vorliegenden Arbeit traten an Position H539, die eng mit der RNA interagiert, keine Mutationen auf.

Santos et al. (2008) bestätigten jüngst anhand von In-vivo-Studien vielmehr, dass Positionen von hoher funktioneller Relevanz (443, 478, 498, 499, 539 und 545) hoch konserviert sind. Diese Tatsache sollte eine vermehrte Beachtung dieser Positionen hinsichtlich potentieller Therapieangriffspunkte verstärken.

6.1.2 Positionen im Primer Grip

Der Primer Grip ist anteilig in den Regionen der Connection und RNase H-Domain lokalisiert. Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass diese Gruppe von Positionen eine wesentliche Rolle für die RNase H-Funktion spielt (Delviks-Frankenberry et al., 2007). An folgenden Positionen führt der Primer Grip die Nukleinsäuren: T473, I505, K476, Q475 und Y501 (DNA-Strang) und R448, N474, Q475 und Q500 (RNA-Strang), in der RNase H-Domain gelegen (Julias et al., 2002). Weiterhin zum Primer Grip zählen folgende Positionen in der Connection Domain: G359, A360, H361, K390, K395, E396 (Delviks-Frankenberry et al., 2007). In Studien mit gezielten Punktmutationen haben Nikolenko et al. gezeigt, dass von den Positionen des Primer Grip die Mehrzahl in der p66 subunit liegt und enge Kontakte zu den Strängen der DNA bzw. RNA aufweist (Delviks-Frankenberry et al., 2007). Drei Ausnahmen sind in der p51 subunit zu finden: K390, K395, E396. Insbesondere Position K390 liegt nur 4 Ångström vom DNA-Strang entfernt und ist die einzige, die mit dem RNA-Strang interagiert. Die Autoren bauten die Aminosäure Alanin gezielt an allen Positionen des Primer Grips ein, außer an Position A360 (K) und T473 (M). Mutierte Positionen in der Connection Domain (bzw. im Primer Grip) wurden entweder mit TAMs oder mit Wildtyp oder mit einer der Finger-Mutationen, K65R, kombiniert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Resistenz gegenüber NRTI, namentlich AZT, geprüft. Es stellte sich in dieser Studie erneut heraus, dass Punktmutationen im Bereich des Primer Grip einen grundsätzlich hemmenden Effekt auf die Funktion der RNase H-Funktion haben. Weiterhin wurde eine relevante Resistenzerhöhung gegenüber AZT festgestellt, wenn TAMs in der Polymerase auftreten. Für die Positionen T473, Q474A, Q475A, N474A zusammen mit Q475A sowie Y501A gilt ebenso, dass Aminosäurenaustausche die RNase H-Funktion einschränken und damit die Initiation der DNA-Synthese beeinflussen (Julias et al., 2002, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Aminosäureaustausch an zwei funktionsrelevanten Positionen beobachtet: G359S und K390R. Alle anderen Positionen blieben auch bei Patienten unter Therapie unverändert.

Position H361 gelangte bereits 2002 in den Fokus verschiedener Arbeitsgruppen (Rausch et al., 2002; Julias et al., 2003). Mutationen an dieser oder anderen Positionen der Connection Domain wurde eine Reduktion der RNase H-Aktivität nachgesagt. In der vorliegenden Arbeit wurde für diese Position eine für alle untersuchten Subtypen umfassende hohe Konservierung gefunden.

6.1.3 Wirkung auf die Enzymfunktion

In den meisten Publikationen (Tisdale et al., 1991; Julias et al., 2002, 2003; Rausch et al., 2002; Nikolenko et al., 2005; Roquebert et al., 2007; Delviks-Frankenberry et al. 2007) dient der Nachweis der Reduktion der viralen Enzymfunktion lediglich dazu, die hohe Relevanz der korrekten Funktion des Primer Grip bzw. des aktiven Zentrums der RNase H zu bestätigen. Er führt jedoch nicht weiter bei der Beantwortung der Frage, ob Mutationen in der Connection und RNase H-Domain in vivo solche Resistenzen auslösen bzw. verstärken, die unter Therapie durch Resistenzmutationen in der Polymerase initiiert werden. Da diese Studien überwiegend in vitro durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob diese Ergebnisse bestätigt werden können. Santos et al. (2008) schlussfolgern eine Reduktion der RNase H-Funktion mit konsekutiver Steigerung der Überlebensfähigkeit des Virus anhand von in vivo detektierten Mutationen an Position A360T/V und T506L. Diese Hypothese basiert auf der Feststellung, dass beide Positionen funktionell relevant sein könnten, nämlich 360 durch engen Kontakt zum Nukleinsäurestrang und 506, aufgrund naher Lage zum Primer Grip. Beide Positionen werden in der vorliegenden Arbeit als weitestgehend konserviert gefunden.

Ehteshami et al. (2008) untersuchten die Relevanz der RNase H-Funktion bezüglich Resistenzmechanismen gegenüber AZT bei Mutationen an N348I und A360V. Insbesondere die Kombination TAM/N348I/A360V führt zu verminderter RNase H-Funktion und somit Steigerung der AZT-Resistenz (Ehteshami et al., 2008).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Wirkung derartiger Mutationen auf die Enzymfunktion nicht dargestellt werden; dennoch ist ein Auftreten dieser potentiell deletär (auf die Enzymfunktion) wirkenden Veränderungen nicht nachgewiesen worden und darf somit ausgeschlossen werden.

Die Positionen A376 und A554 erwiesen sich in dieser Arbeit als natürlicherweise hoch polymorph. Diese Heterogenität trat sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Patienten gleichermaßen auf. Daher kann diesen Veränderungen keine besondere Relevanz hinsichtlich der Enzymfunktion bzw. der Resistenzmechanismen zugeschrieben werden.

6.1.4 Spezifizierung nach Subtypen

An einigen Positionen im untersuchten Sequenzabschnitt differieren die Aminosäuren subtypenspezifisch (siehe Abschnitt 5.3). Auch in dieser Arbeit finden sich für die Subtypen B und A natürlicherweise unterschiedliche Aminosäuren an ein und derselben Position, z.B. an Position 376 (A für Subtyp B bzw. V für Subtyp A) und 286 (A für Subtyp A bzw. T für Subtyp B).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Patientensequenzen nach ihrem Subtyp unterteilt und die Referenzsequenzen für die einzelnen Subtypen getrennt berechnet. Dadurch konnten die Aminosäurevariabilitäten, welche von Nikolenko et al. (2007; 2008) und Roquebert et al. (2007) in ihren In-vitro- bzw. In-vivo-Studien in der RNase H und Connection Domain gefunden wurden, als natürliche Polymorphismen eingestuft werden.

Offenbar nicht streng nach Subtypen unterschieden haben Roquebert et al. bei ihrem großen Patientenpool (118 behandelte, 26 unbehandelte Patienten; Roquebert et al., 2007); tatsächlich wurde als Vergleichssequenz zufällig die HXB2-Sequenz (Subtyp B) herangezogen. Für drei der vier von ihnen auf dieser Basis als signifikant eingestuften Mutationen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein natürlicher Polymorphismus nachgewiesen: für Positionen 469, 470 und 554. Auch die erhöhte „Mutationsfrequenz“, die die Autoren an Positionen behandelter Patienten im Vergleich zu unbehandelten fanden, kann bei Zugrundelegung des subtypspezifischen Aminosäuremusters als natürlicher Polymorphismus gedeutet werden.

In der Arbeit von Nikolenko et al. (2007) zeigten sich bei fünf von sieben behandelten Patienten Aminosäureaustausche, die in Kombination mit TAMs unter AZT-Therapie selektiert wurden und bei denen eine Resistenzerhöhung gegenüber AZT gemessen wurde – im Vergleich zu wildtyphaltigen Polymerasen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten bei der Bewertung der sequenzierten Positionen E312, G335, N348, A360, V365 und A376 einen hohen natürlichen Polymorphismus (Position A376T/S/V) oder starke Konservierung (Positionen E312, N348, A360, V365) bzw. subtypenspezifische Differenzen (335: D für Subtyp A, G für Subtyp B). Insbesondere für die Position N348 finden wir diese starke Konservierung, entgegen jüngerer Studien von Götte (2007), Yap et al. (2007), Ehteshami et al. (2008), Hachiyia et al. (2008) und Delviks-Frankenberry et al. (2008), welche sogar eine Neueingliederung dieser Position bei Auftreten der Mutation von N348I als TAM befürworten (Götte, 2007). Die Gruppe um Hachiyia et al. (2008) wies bei einer Datenbankabfrage eine hohe Prävalenz dieser Mutation an Position 348 nach und klassifizierte sie als multi-drug-resistant (MDR). Die hohe Prävalenz kann mit einer geringen genetischen Barriere erklärt werden, da ein einziger Nukleotidaustausch von A zu T zu N348I im Rahmen einer AZT Therapie führen kann (Hachiyia et al., 2008). Aufgrund der engen Lage zur Daumenregion der Subdomäne werden als Folge der Mutation Flexibilitäts- und Mobilitätsänderungen in diesem Bereich

angenommen (Hachyia et al., 2008). Santos et al. (2008) fanden für Position 360 eine unter AZT exklusiv auftretende Mutation von A zu V/T. Die Differenz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur zitierten Literatur mag auf uneinheitliche Verwendung der Referenzsequenz, uneinheitliche Subtypen-Differenzierung sowie andere, aktuellere Therapieregime und daher veränderten Selektionsdruck zurückzuführen sein. Weiterhin besteht eine limitierte statistische Aussagekraft durch relativ kleine Patientengruppen.

Sämtliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in vergleichbarem Verhältnis sowohl in der Gruppe der behandelten als auch in der der unbehandelten Patienten gefunden. Ein die Resistenz verstärkender Zusammenhang ist für diese Positionen somit in vivo wenig wahrscheinlich.

Auch Brehm et al. (2007, 2008) wiesen (in vitro) signifikante Mutationen an den Positionen A371V und Q509L nach; diesen wird eine die AZT-Resistenz verstärkende Funktion zugesprochen (Brehm et al., 2007, 2008). Allerdings wurde dies nur einmalig experimentell nachgewiesen und nur unter der TAM-Kombination D67N und K70R beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit hingegen tritt die genannte Mutation an 371 bei verschiedenen TAM-Kombinationen auf, aber ist ebenso in der Gruppe der Unbehandelten zu finden. Eine Datenbankabfrage der institutseigenen Datenbank der RT-Sequenzen der Jahre 2000-2004 ergab weiterhin, dass aus einer Gesamtzahl von 1249 RT-Sequenzen bei 166 Sequenzen die TAMs D67N+K70R auftraten (13,3%). Nur bei 9 (0,7%) von diesen 1249 RT-Sequenzen trat die Kombination D67N+K70R ohne weitere TAMs (z.B. M41L, L210W, T215Y, T215F, K219Q, K219E) auf. Nur bei isoliertem Vorliegen von D67N+K70R (Bewertung: intermediär) könnte es zu einer Fehlbewertung der Resistenzstufe für AZT kommen, wenn die Mutationen A371V und Q509L gleichzeitig vorlägen. Liegt nur eine weitere TAM zusammen mit D67N+K70R vor, würde diese Sequenz schon als resistent eingestuft werden, und das zusätzliche Vorliegen von A371V+Q509L wäre für die Bewertung unerheblich. Um eine mögliche Fehlbewertung bei 0,7% der RT-Sequenzen für AZT zu vermeiden, ergibt sich also die Empfehlung, bei isoliertem Vorliegen der Kombination D67N+K70R die Sequenzierung auf die Connection- und RNase H-Domänen auszuweiten oder vorsorglich AZT als resistent einzustufen.

Position Q509 zeigt sich im Rahmen dieser Arbeit als hoch konserviert; ein Zusammenhang mit Therapie wird als unwahrscheinlich angenommen.

Es zeigt sich, dass in den letztgenannten Arbeiten der Verzicht auf eine Trennung nach Subtypen die Aussagekraft der Ergebnisse massiv einschränkt und zu unbewiesenen Schlüssen führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird empfohlen, künftige Experimente strikt nach Subtypen zu unterscheiden. Auch sollte in Zukunft für jeden Subtypen eine balancierte Consensus-Sequenz als eigenständige subtypenspezifische Referenzsequenz entwickelt werden, wie es zuletzt die Gruppe um Santos et al. (2008) durchgeführt hat. So kamen Santos et al. für zwei der Schlüsselpositionen auch zu ähnlichen Ergebnissen (A371V, K390R) wie die vorliegende Arbeit. Darüber hinaus fand diese Arbeit an weiteren, bereits aus der Literatur bekannten Positionen (G359S, A360V/T, A371V, K390R) sowie an vorher als nicht relevant gedeuteten Positionen (R358K, K366R, I506L, K527N, K530R, Q547K, A400T) Mutationen, die auf einen Zusammenhang mit Therapie hindeuten könnten. Im hier untersuchten Kollektiv waren die Positionen 358, 506, 530 und 547 hoch konserviert, während die Positionen 366, 400 und 527 sowohl bei Behandelten als auch bei Unbehandelten eine hohe Variabilität aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte in lokalen Virusvarianten liegen oder im Selektionsdruck durch unterschiedliche Therapieregime.

Die von der Gruppe selbst untersuchten wurden um in Datenbanken bereits gespeicherte Patientendaten für die Bewertung ergänzt. Weiterhin könnte von einer geringfügig anderen Variante des Virusstammes ausgegangen werden. Auffällig ist, dass die Gruppe weder für Position 333 noch für Position 558 Mutationen unter Therapie nachwies.

6.2 Therapeutischer Einfluss auf potentielle Mutationen

Der folgende Abschnitt geht der Frage nach, ob der Einsatz bestimmter Medikamente oder Wirkstoffklassen einen erkennbaren Einfluss auf die Mutationshäufigkeit in der Connection und der RNase H-Domain hat. Vergleicht man die Aminosäureverteilung der Gruppe der behandelten mit der der unbehandelten Patienten, so zeigt sich ein möglicher Therapieeinfluss an den fünf Positionen G333E/D, G359S, A371V, K390R und K558R. Mit hoher statistischer Signifikanz bestätigt sich dieser Einfluss an all diesen Positionen beim Vergleich der Gruppe der behandelten Patienten mit der Referenzsequenz. Unterschiede zwischen den Therapeutika lassen sich gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur vermuten, jedoch wegen der häufig durchgeführten Kombinationstherapien nicht explizit nachweisen.

6.2.1 Position 333

Für Position G333E/D wird in dieser Arbeit eine Tendenz zur Kombination mit Resistenzmutationen und erhöhter Resistenz beobachtet. In klinischen Studien zur Untersuchung des Effekts der Kombination von AZT und 3TC auf die Viruspersistenz (Boucher et al., 1993) stellte sich heraus, dass bei einigen mit AZT behandelten Patienten die Kombination beider Therapeutika nicht wie bei den meisten zu einer Verbesserung der Behandlung beitrug, sondern im Gegenteil Resistenz verzeichnet wurde. Diese duale Resistenz unter kombinierter Therapie von AZT und 3TC wurde von Kemp et al. (1998) experimentell untersucht und bei Auftreten des Aminosäureaustausches von Glycin (neutral geladen) zu Glutamat (negativ geladen) bzw. Aspartat (an Position 333; siehe Abschnitt 5.1.2; ebenso negativ geladen) bestätigt und auf die Therapiekombination zurückgeführt. Dies bestätigt auch die vorliegende Arbeit, indem diese Mutationen am häufigsten gemeinsam mit der Mutation an Position M184V verzeichnet wurden; an dieser Position auftretende Mutationen führten bereits nach kurzer Zeit zu 3TC-Resistenz (Boucher et al., 1993; Tisdale et al., 1993). In der Kombination mit anderen Therapeutika, u.a. AZT, kommt es zu einer Sensitivierung gegenüber AZT bei bereits bestehenden Resistenzmutationen an M184V unter 3TC-Therapie, so dass diese Kombination sinnvoll ist (Götte, 2007). Die Mechanismen, welche zu der dualen Resistenz gegenüber AZT und 3TC führen, untersuchten und bestätigten Zelina et al. (2007) erneut.

Weiterhin zögert die kombinierte Therapie bei noch unbehandelten Patienten die Resistenz gegenüber AZT hinaus, wobei die absolute Resistenz auslösende Punktmutation an Position M184 zeitlich sehr nah am Therapiebeginn liegt (Larder et al., 1995). Ähnliche Veränderungen mit demselben Effekt wurden u.a. an den Positionen G359S, A371V, I375V, T376A, K390R, E404D, F414Y, K558R gefunden (Kemp et al., 1998). Ein ähnlicher Mechanismus für den Aminosäureaustausch wird für die nahe gelegene Position G335 vermutet (Nikolenko et al., 2007). Jene Auswirkungen, die den Veränderungen an Position G333 zugesprochen werden, werden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. So triggert vermutlich vorrangig die an M184V auftretende Resistenzmutation eine Mutation an Position 333 (siehe Abschnitt 5.1.2, Tabelle 13). Der Vergleich der Gruppe behandelter mit der unbehandelten Patienten ($p = 0,0613$) bestätigt diese Annahme noch nicht, wohl aber ihr Vergleich mit der Referenzsequenz ($p = 0,0367$). Nach Götte (2007) zeigt sich ein Polymorphismus an dieser Position, sowohl bei Behandelten als auch Unbehandelten. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch eindeutig auf eine Korrelation der Mutation zur Therapie hin (siehe Abschnitt 5.1.2, Tabelle 13 und Anhang A.2, Tabelle A1). Eine Korrelation ist für Mutationen an Position G335 nicht erkennbar; sie fällt dahingehend auf, dass sie natürlicherweise für die verschiedenen Subtypen (in diesem Fall A und B, siehe auch Anhang A.2, Tabellen A1 und A2) durch verschiedene Aminosäuren besetzt wird.

6.2.2 Position 359

Position G359S ist insofern als besonders zu betrachten, als sie im Primer Grip gelegen ist und vermutlich zu dessen Funktionsfähigkeit beiträgt. Mit $p = 0,0394$ (behandelte Patienten versus Unbehandelte) beziehungsweise $0,0001$ (behandelte Patienten versus Referenzsequenz) lässt sich eindeutig ein Zusammenhang zu Therapie, insbesondere NRTI-Therapie, d.h. Mutationen im Bereich der Finger-Domäne nachweisen (siehe Abschnitt 5.1.2, Tabelle 13). Bereits Delviks-Frankenberry et al. (2007) hatten in In-vitro-Studien eine deletäre Auswirkung von Mutationen im Primer Grip-Bereich nachgewiesen. In vivo kann der Therapie-zusammenhang sowohl durch die Arbeiten von Cane et al. (2007) und Santos et al. (2008) sowie die hier vorliegende Arbeit bestätigt werden. In der Arbeit von Cane et al. (2007) wird allerdings nicht klar, worauf die erwähnte und zur Bewertung herangezogene Consensus Sequenz beruht. Aussagen über die tatsächliche Auswirkung auf die Enzymfunktion sind im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nicht möglich. Hinzu kommt ein klarer Subtypenunterschied, wobei im Durchschnitt Serin (S) bei Subtyp A und Glycin (G) bei Subtyp B zu finden ist (siehe Anhang A.2, Tabellen A1 und A2 für Position 359). Der Primer Grip ist eine funktionell wichtige Region und daher stark konserviert. Wenn unter Therapie eine derart deutliche Verschiebung der Aminosäurebelegung auftritt, heißt das, dass der Nachteil durch Verlust an replikativer Fitness für das resistente Virus durch den Gewinn infolge von Resistenz mehr als aufgewogen werden muss. Wie der Mechanismus der Kompensation geartet ist, welche Substanzen die Selektion beeinflussen und wieso bei Subtyp A bereits der Wildtyp an Position 359 ein Serin aufweist, wären interessante Fragen für weiterführende Forschungen.

6.2.3 Position 371

Position A371V gehört zu den fünf Positionen, deren Veränderung einen Zusammenhang zu erfolgter Therapie, insbesondere NRTI-Therapie, vermuten lässt ($p = 0,1220$ für behandelte Patienten versus Unbehandelte). Der Vergleich der Gruppe der behandelten Patienten mit der Referenzsequenz liefert einen Wert von $p = 0,0001$ und bestätigt diese Vermutung. Zwar ist diese Veränderung auch in der Gruppe der Unbehandelten zu finden, doch überwiegt die Häufigkeit der Mutation bei den behandelten Patienten. Die Relevanz, die Brehm et al. der Mutation an dieser Position zusprechen (Brehm et al., 2007, 2008), wurde in ihren Experimenten nur einmalig nachgewiesen. Die Gruppe um Santos et al. (2008) hat eine spezifisch unter Monotherapie mit AZT (und sicher nicht erfolgter Therapie mit anderen Medikamenten) selektierte Mutation an dieser Position in vivo nachgewiesen.

Im Rahmen der Ausführungen im Abschnitt 6.1.4 und aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird geraten, beim Auftreten der spezifischen Mutationskombination D67N+K70R ohne weitere TAMs entweder die Connection und RNase H-Domain gezielt bezüglich dieser Positionen (371 sowie auch 509) zu untersuchen oder die Sequenz vorsorglich als resistent zu bewerten. Die Häufigkeit dieser kombinierten Mutation ist jedoch gering. Darüber hinaus zeigte sich Position 509 in der vorliegenden Studie hoch konserviert.

6.2.4 Position 390

Die gehäufte Mutation von Lysin (K) zu Arginin (R) an Position 390 ist auffällig ($p = 0,1366$ für behandelte Patienten versus Unbehandelte). Ein Zusammenhang zwischen Therapie und dieser Veränderung ist damit sehr wahrscheinlich und wird durch den Vergleich der Gruppe der behandelten Patienten mit der Referenzsequenz bestätigt ($p = 0,025$). Der Einfluss dieser Punktmutation sollte hinsichtlich der verschiedenen praktizierten Therapieschemata jedoch eingegrenzt werden. Die ansatzweise durchgeführte Subanalyse der verschiedenen Therapeutikagruppen lässt darauf schließen, dass diese Mutation insbesondere im direkten Zusammenhang mit einer NNRTI-Therapie stehen könnte – wie genau, lässt sich in dieser Arbeit nicht

klären, da in den meisten Fällen kombinierte Therapie erfolgten, deren Wirkungen sich nicht voneinander trennen lassen. Santos et al. (2008) stellen in ihrer In-vivo-Arbeit jedoch einen ziemlich sicheren Zusammenhang mit AZT-Therapie für die Mutation an Position 390 dar. Wieso es zwischen der Arbeit von Santos et al. und der vorliegenden bezüglich der Interpretation des Therapieeinflusses zu Differenzen kommt, lässt sich möglicherweise mit der geografischen und Anzahl-Differenz zwischen den Patientenmaterialien erklären. Aufgeworfene Fragen lauten weiterhin:

- Warum weist Position 390, ebenso wie Position 359 im Primer Grip gelegen und als einzige mit der RNA interagierend, eine solche Mutationshäufigkeit auf?
- Welche Folgen hat dies für die Enzymfunktion im Kleinen (in der RNase H-Domain) und welche global (für die Funktion der gesamten Reversen Transkriptase)?

Bei dem Versuch, speziell die Positionen des Primer Grip hinsichtlich ihrer Relevanz für die Enzymfunktion zu untersuchen, fanden Delviks-Frankenberry et al. (2007) für die mutierte Position K390R, gelegen in der p51 subunit, keine Abweichungen von den restlichen Ergebnissen. Auch hierfür dürften die mangelhafte Subtypen-Trennung, die zufällige unspezifische Auswahl einer Referenz sowie die unnatürlichen Bedingungen der (In-vitro-) Experimente verantwortlich sein. Eine gezielte phänotypische Analyse von K390R in Kombination mit entweder TAM-Finger-Mutationen oder unter NNRTI-Therapie selektierten Resistenzmutationen oder speziell der Mutation M184V in einem Subtyp B Standardvirus könnte genaueren Aufschluss über den zugrunde liegenden Mechanismus und das Ausmaß der Resistenzänderung geben.

6.2.5 Position 558

Die Position K558R, vorletzte Aminosäure der RNase H-Einheit und damit des gesamten Enzyms Reverse Transkriptase, zeigt im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Gruppe der behandelten Patienten eine häufigere Mutationsfrequenz als in der der Unbehandelten ($p = 0,0576$). Im Vergleich zur Referenzsequenz bestätigt sich ein signifikanter Unterschied der Aminosäureverteilung mit $p = 0,0373$. Der Aminosäureaustausch von K (Lysin) zu R (Arginin) ist insofern nicht gravierend, als kein Ladungswechsel stattfindet (beide sind positiv geladen); doch es fällt auf, dass er insbesondere bei Patienten auftritt, die entweder Finger-Mutationen oder TAMs unter NRTI-Behandlung entwickelt hatten. Eine Trennung der verschiedenen Therapeutika-Gruppen (NRTIs, NNRTIs, TAMs, Mutationen im Finger-Bereich) ist zumeist nicht möglich. Das von Roquebert et al. gefundene gehäufte Auftreten dieser Mutation bei Patienten, die TAMs aufweisen (Roquebert et al., 2007), wird durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt. Diese Diskrepanz dürfte auf die unklare Subtypen-Trennung und die zufällige Referenzsequenz-Auswahl der Autoren zurückzuführen sein.

Die gezielte Punktmutation (site-directed mutagenesis) dieser Position bei verschiedenen Patienten wäre für die verschiedenen Resistenzmutationen der Polymerase bzw. den Wildtyp zu befürworten. Die Gruppe um Santos fand an dieser Position keine Hinweise auf Mutation im Zusammenhang mit Therapie (Santos et al., 2008).

6.2.6 Auswirkungen der Resistenzmutationsgruppen

Weil sich die verschiedenen Resistenzmutationsgruppen auf Grund von Kombinationstherapien zumeist nicht separieren lassen, ist ihre Unterscheidung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich.

Die detaillierte Betrachtung der Connection Domain durch Delviks-Frankenberry et al. (2007; 2008) führt zu der These, dass Mutationen in dieser Region die Resistenz gegenüber AZT

steigern; die Sequenzen von je sieben unbehandelten und behandelten Patienten wurden dazu untersucht. Die C-terminale Domäne dieser Patienten wurde sowohl mit Wildtyp- als auch mit TAMs beinhaltenden Polymerase-Domänen kombiniert und auf eine veränderte Enzymfunktion hin geprüft. Bei der getrennten Bewertung von Connection und RNase H-Domain stellte sich heraus, dass die Mutationen der Connection Domain, die unter AZT-Therapie vermehrt auftraten, einen viel größeren Effekt auf die Resistenzsteigerung hatten als solche Veränderungen, die sich im Bereich der RNase H fanden. Dazu wurden die Polymerase-Domänen mit einer definierten TAM-Kombination (D67N, K70R, T215Y, K219Q) der Connection Domain bzw. der RNase H-Domain gegenübergestellt; alle Patientensequenzen bis auf einen Fall zeigten eine Resistenzsteigerung gegenüber AZT in Kombination mit Mutationen in der Connection Domain; in der Ausnahmesequenz war diese Resistenzsteigerung nicht zu verzeichnen. Genauere Analysen der Polymerase-Domäne dieses einen Patienten zeigten, dass er möglicherweise unter vorheriger 3TC-Therapie zusätzlich zu den TAM-Mutationen solche an M184V und L74V aufwies und damit eine höhere Sensitivität gegenüber AZT zeigte. Die Kombination dieser beiden Mutationen spielte die entscheidende Rolle hinsichtlich des Resistenzverhaltens, einzeln war ihr Einfluss bedeutend geringer.

Dieser Einzelfall weist darauf hin, wie wichtig die klare Unterscheidung zwischen den einzelnen Resistenzmutationen der Polymerase-Domäne ist, um Aussagen über mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Enzymfunktionen machen zu können. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse dieses Einzelfalls reproduzierbar und wie belastbar sie in der Praxis sind, da es für die wenigsten Patienten realistisch ist, eine klare Trennung der Mutationen im Zusammenhang mit der medikamentösen Behandlung herzustellen; dies liegt zum einen an den Kombinationstherapieschemata und zum anderen daran, dass häufig nicht klar bzw. erst (zu) spät erkennbar ist, mit was für einem Virus sich der Patient infiziert hat.

6.3 Korrelation der aktiven Zentren

Anhand der Kristallstruktur der Reversen Transkriptase wurde untersucht, inwiefern die aktiven Zentren von Polymerase und RNase H in Verbindung stehen. Demnach könnten Mutationen an solchen Positionen, die bis zu 4 Ångström nah an der DNA bzw. RNA liegen, zu funktionellen Verschiebungen führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird empfohlen, für ein besseres und fundiertes Gesamtverständnis der Molekülfunktion diese Annahmen näher zu untersuchen.

Position G333 befindet sich u.a. in der Nähe zur Basis der Daumenregion, die mit dem Matrizen-Strang interagiert (Kemp et al., 1998; Zelina et al., 2008). Hier stellen sich folgende Fragen:

- Führen Mutationen, die an dieser Position die neutrale Aminosäure Glycin zu Glutamat bzw. Aspartat tauschen, zu Veränderungen, die bis hin zur ca. 42 Ångström entfernten Polymerase funktionelle Auswirkungen haben?
- Bestehen funktionelle Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen aktiven Zentren?

6.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben folgende Schlussfolgerungen.

Fünf der 309 untersuchten Positionen weisen einen Zusammenhang zu erfolgter Therapie auf. Daneben existieren eine Vielzahl hoch polymorpher sowie stark konservierter Positionen, die dabei keine Rolle spielen. Hoch konserviert sind vorrangig solche Positionen, die für die Funktion des Enzyms essentiell sind. Um zu diesen Ergebnissen zu kommen, ist es nötig, die

Sequenzen strikt nach Subtypen zu trennen und ausschließlich gegen eine klar definierte subtypenspezifische Referenzsequenz abzugleichen.

Derzeitige Resistenzanalysen müssen nicht auf den Bereich der Connection und RNase H-Domain ausgedehnt werden. Für weiterführende Arbeiten könnte es fruchtbar sein, die Positionen G333E/D, G359S, A371V, K390R und K558R gezielt zu punktmutieren, separat mit den verschiedenen Resistenzmutationsformen der Polymerase zu kombinieren und mit einer patienteneigenen Wildtyp-Polymerase zu vergleichen. Die Resultate dürften einen Grundstein für weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Ausprägung dieser Mutationen bilden. Mehrere verschiedene Arbeiten zur Frage der ART-selektierten Mutationen im Bereich der RNase H kommen überraschenderweise zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen. Die Benutzung einer subtypenspezifischen Referenzsequenz wäre ein sinnvoller Ansatz für eine bessere Vergleichbarkeit.

Insbesondere die Aufklärung der Funktion der im Primer Grip gelegenen Positionen G359 und K390, welche aufgrund der vorliegenden Daten statistisch häufig unter Therapie mutieren, ist notwendig. Belastbare Aussagen über die Enzymfunktion sollten mit diesen Mutationen in Zusammenhang gebracht und daraus abgeleitet werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob in der Connection Domain und der RNase H-Domain der Reversen Transkriptase des HI-Virus Mutationen auftreten und ob ihr Auftreten im Zusammenhang zu Therapie bzw. Resistenzmutationen im Bereich der Polymerase steht.

Dazu wurden 57 Blutproben unbehandelter und behandelter HIV-erkrankter Patienten sequenziert und mit einer neu erstellten subtypenspezifischen Referenzsequenz verglichen. Die Differenzierung nach Subtypen erwies sich als entscheidend für das Verständnis und die Auswertung der Resultate. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde nur durch Santos et al. angewendet (Santos et al., 2008). Die Auswertung der vorliegenden Sequenzen ergab, dass einige in der Literatur als auffällig angesehene Mutationen als natürliche Polymorphismen zu bewerten sind. Für fünf Positionen hingegen (G333E/D, G359S, A371V, K390R, K558R) wurden Mutationen mit hoher statistischer Signifikanz verstärkt in der Gruppe der Therapierten gefunden.

Die Gruppe um Santos kam für drei der Schlüsselpositionen zu ähnlichen Ergebnissen (G359S, A371V, K390R), jedoch fand sie für die Positionen 333 und 558 keine Mutationen unter Therapie. Der bereits mehrfach publizierte Zusammenhang zwischen Mutationen in der Connection Domain bzw. in der RNase H-Domain einerseits und Resistenzmutationen und Resistenzsteigerungen in der Polymerase andererseits konnte auf Basis der vorliegenden Ergebnisse für die fünf Positionen bestätigt werden. Im Vergleich mit den institutseigenen Proben treten die Mutationen an zwei dieser fünf Positionen lediglich mit schwacher statistischer Signifikanz auf. Dies wird mit der geringen Größe des untersuchten Kollektivs erklärt. Die Gegenüberstellung des Kollektivs behandelter Patienten mit der großen Gruppe unbehandelter Patienten aus der Referenzsequenz ergibt für jede der fünf genannten Positionen einen signifikanten Unterschied (siehe Abschnitt 5.1.2, Tabelle 13).

Die Arbeit zeigt, dass erst die Verwendung subtypenspezifischer Referenzsequenzen zu belastbaren Ergebnissen führt. Diese decken sich zum Teil mit dem gegenwärtigen Forschungsstand, führen vereinzelt jedoch auch zu neuen Resultaten. Die meisten publizierten Arbeiten unterscheiden nicht nach Subtypen. Wünschenswert für künftige Arbeiten wäre der breitere Einsatz subtypenspezifischer Referenzsequenzen.

Literaturverzeichnis

- Arion, D., N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow, M. A. Parniak. 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*. 37:15908-15917.
- Arnold, E., J. Ding, S. H. Hughes, Z. Hostomsky. 1995. Structures of DNA and RNA polymerases and their interactions with nucleic acid substrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:27-38.
- Barré-Sinoussi, F., J. C. Cherman, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220:868-871.
- Boucher, C. A., N. Cammack, P. Schipper, R. Schuurman, P. Rouse, M. A. Wainberg, J. M. Cameron. 1993. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in-vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2231-2234.
- Brehm, J. H., D. Koontz, J. D. Meteer, V. Pathak, N. Sluis-Cremer, J. W. Mellors. 2007. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *J Virol*. 81:7852-7859.
- Brehm, J. H., J. W. Mellors, N. Sluis-Cremer. 2008. Mechanism by which a Glutamine to Leucine substitution at residue 509 in the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine resistance. *Biochemistry*. 52:14020-14027.
- Budhias, S. R., I. Gorshkova, S. Gaidamakov, A. Wamiru, M. K. Bona, M. A. Parniak, R. J. Crouch, J. B. McMahon, J. A. Beutler, S. F. Le Grice. 2005. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res.* 33(4):1249-1256.
- Cane, P. A., H. Green, E. Fearnhill, D. Dunn. 2007. Identification of accessory mutations associated with high-level resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS*. 21:447-455.
- Castro, H. C., N. I. Loureiro, M. Pujol-Luz, A. M. Souza, M. G. Albuquerque, D. O. Santos, L. M. Cabral, I. C. Frugulhetti, C. R. Rodrigues. 2006. HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutic target in the spotlight. *Curr. Med Chem.* 13:313-324.
- Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188.
- Margolis, D. 2007. RNase H inhibitors: Obstacles to Developments. www.natap.org/2007/CROI.
- Delviks-Frankenberry, K. A., G. N. Nikolenko, R. Barr, V. K. Pathak. 2007. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *J Virol*. 81:6837-6845.
- Delviks-Frankenberry K. A., G. N. Nikolenko, P. L. Boyer, S. H. Hughes, J. M. Coffin, A. Jere, V. K. Pathak. 2008. HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations reduce template RNA degradation and enhance AZT excision. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:10943-10948.

- Ding, J., K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, E. Arnold. 1998. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol. Biol.* 284:1095-1111.
- Ehteshami, M., G. L. Beilhartz, B. J. Scarth, E. P. Tchesnokov, S. McCormick, B. Wynhoven, P. R. Harrigan, M. Götte. 2008. Connection domain mutations N348I and 360V in HIV-1 reverse transcriptase enhance resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine through both RNase H-dependent and -independent mechanisms. *J Biol. Chem.* 283:22222-22232.
- Frankel, A. D., and J. A. Young. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67:1-25.
- Goldschmidt, V., and R. Marquet. 2004. Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem. Cell Biol.* 36:1687-1705.
- Gopalakrishnan, V., J. A. Peliska, and S. J. Benkovic. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: spatial and temporal relationship between the polymerase and RNase H activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:10763-10767.
- Gotte, M., G. Maier, H. J. Gross, H. Heumann. 1998. Localization of the active site of HIV-1 reverse transcriptase-associated RNase H-Domain on a DNA template using site-specific generated hydroxyl radicals. *J Biol. Chem.* 273:10139-10146.
- Götte, M. 2007. Should we include connection domain mutations of HIV-1 reverse transcriptase in HIV-1 resistance testing? *PLoS Med.* 4(12):e346.
- Hachiya, A., E. Kodama, S. Sarafianos, M. Schuckmann, Y. Sakagami, M. Matsuoka, M. Takiguchi, H. Gatanaga, S. Oka. 2008. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol.* 82:3261-3270.
- Himmel, D. M., S. G. Sarafianos, S. Dharmasena, M. M. Hossain, K. Coy-Simandle, T. Ilina, A. D. Clark, Jr., J. L. Knight, J. G. Julias, P. K. Clark, K. Krogh-Jespersen, R. M. Levy, S. H. Hughes, M. A. Parniak, E. Arnold. 2006. HIV-1 reverse transcriptase structure with RNase H inhibitor dihydroxy benzoyl naphthyl hydrazone bound at a novel site. *ACS Chem. Biol.* 1:702-712.
- Johnson, V. A., F. Brun-Vezinet, B. Clotet, D. R. Kuritzkes, D. Pillay, J. M. Schapiro, D. D. Richman. 2006. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top. HIV. Med* 14:125-130.
- Julias, J.G., A. L. Ferris, P. L. Boyer, S. H. Hughes. 2001. Replication of phenotypically mixed human immunodeficiency virus type 1 virions containing catalytically active and catalytically inactive reverse transcriptase. *J Virol.* 75(14):6537-6546.
- Julias, J. G., M. J. McWilliams, S. G. Sarafianos, E. Arnold, S. H. Hughes. 2002. Mutations in the RNase H-Domain of HIV-1 reverse transcriptase affect the initiation of DNA synthesis and the specificity of RNase H cleavage in-vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:9515-9520.
- Julias, J. G., M. J. McWilliams, S. G. Sarafianos, W. G. Alvord, E. Arnold, S. H. Hughes. 2003. Mutation of amino acids in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that contact the template-primer affects RNase H activity. *J Virol.* 77:8548-8554.
- Kataba, H., O. Kurosawa, I. Arai, M. Washizu, S. A. Margaron, R. E. Glass, N. Shimoto. 1993. Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science.* 262:1561-1563.

- Kemp, S. D., C. Shi, S. Bloor, P. R. Harrigan, J. W. Mellors, B. A. Larder. 1998. A novel polymorphism at codon 333 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase can facilitate dual resistance to zidovudine and L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol.* 72:5093-5098.
- Kilby, J. M., M. B. Marques, D. L. Jaye, P. B. Taberaux, V. B. Reddy, K. B. Waites. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine.* 4:302-1307.
- Klumpp, K., J. Q. Hang, S. Rajendran, Y. Yang, A. Derosier, K. Wong, I. H. Overton, K. E. Parkes, N. Cammack, J. A. Martin. 2003. Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 31:6852-6859.
- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, T. A. Steitz. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-1790.
- Larder, B. A., S. D. Kemp, P. R. Harrigan. 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269:696-699.
- Miller, M. D., B. Feuston, V. Munshi, K. Getty, J. Krueger, D. J. Hazuda, M. A. Parniak, D. Lewis, J. A. Grobler, C. A. Shaw-Reid. 2005. An HIV-1 RNase H inhibitor synergizes with three different classes of RT polymerase inhibitors in an in-vitro Reverse Transcription assay. *Antivir. Ther.* 10(Suppl.1):S90.
- Mansky, L. M., and H. M. Temin. 1995. Lower in-vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.* 69:5087-5094.
- Matzen, K., L. Elzaouk, A. A. Matskevich, A. Nitzsche, J. Heinrich, K. Moelling. 2007. RNase H-mediated retrovirus destruction in-vivo triggered by oligodeoxynucleotides. *Nat. Biotechnol.* 25:669-674.
- Meyer, P.R., S. E. Matsuura, A. M. Mian, A. G. So, W. A. Scott. 1999. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell.* 4: 35-43.
- Nikolenko, G. N., E. S. Svarovskaia, K. A. Delviks, V. K. Pathak. 2004. Antiretroviral drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increase template-switching frequency. *J Virol.* 78:8761-8770.
- Nikolenko, G. N., S. Palmer, F. Maldarelli, J. W. Mellors, J. M. Coffin, V. K. Pathak. 2005. Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:2093-2098.
- Nikolenko, G. N., K. A. Frankenberry, S. Palmer, F. Maldarelli, J.W. Mellors, J. M. Coffin, V. K. Pathak. 2006. The HIV-1 reverse transcriptase connection domain from treatment-experienced patients contributes to AZT resistance. *Antivir. Ther.* 11:S142.
- Nikolenko, G. N., K. A. Delviks-Frankenberry, S. Palmer, F. Maldarelli, M. J. Fivash, Jr., J. M. Coffin, V. K. Pathak. 2007. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:317-322.
- Palaniappan, C., G. M. Fuentes, L. Rodriguez-Rodriguez, P. J. Fay, R. A. Bambara. 1996. Helix structure and ends of RNA/DNA hybrids direct the cleavage specificity of HIV-1 reverse transcriptase RNase H. *J Biol. Chem.* 271:2063-2070.

- Pomerantz, R. J., and D. L. Horn. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med* 9:867-873.
- Radzio, J., and N. Sluis-Cremer. 2007. Efavirenz accelerates HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H cleavage, leading to diminished zidovudine excision. *Mol. Pharmac.* 73:601-606.
- Rausch, J. W., D. Lener, J. T. Miller, J. G. Julias, S. H. Hughes, S. F. Le Grice. 2002. Altering the RNase H primer grip of human immunodeficiency virus reverse transcriptase modifies cleavage specificity. *Biochemistry* 41:4856-4865.
- RKI (Robert Koch Institut). 2007. Halbjahresbericht II/2006.
- Roquebert, B., M. Wirden, A. Simon, J. Deval, C. Katlama, V. Calvez, A. G. Marcelin. 2007. Relationship between mutations in HIV-1 RNase H-Domain and nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations in naive and pre-treated HIV infected patients. *J Med. Virol.* 79:207-211.
- Ruß, A., and Endres S. 2005. *Arzneimittel Pocket plus 2005*. S242. Börm Bruckmeier Verlag.
- Santos, A. F. A., R. B. Lengruher, E. A. Soares, A. Jere, E. Sprinz, A. M. B. Martinez, J. Silveira, F. S. Sinon, V. K. Pathak, M. A. Soares. 2008. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS ONE*. www.plosone.org. 3(3):e1781.
- Sarafianos, S.G., K. Das, A. D. Clark, Jr., J. Ding, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold. 1999. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:10027-32.
- Sarafianos, S. G., K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold. 2001. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J* 20:1449-1461.
- Schatz, O., F. V. Cromme, F. Gruninger-Leitch, S. F. Le Grice. 1989. Point mutations in conserved amino acid residues within the C-terminal domain of HIV-1 reverse transcriptase specifically repress RNase H function. *FEBS Lett.* 257:311-314.
- Schatz, O., J. Mous, S. F. Le Grice. 1990. HIV-1 RT-associated ribonuclease H displays both endonuclease and 3'---5' exonuclease activity. *EMBO J* 9:1171-1176.
- Tanese, N., and S. P. Goff. 1988. Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:1777-1781.
- Tisdale, M., T. Schulze, B. A. Larder, K. Moelling. 1991. Mutations within the RNase H-Domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase abolish virus infectivity. *J Gen. Virol.* 72 (Pt 1):59-66.
- Tisdale, M., S. D. Kemp, N. R. Parry, B. A. Larder. 1993. Rapid in-vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:5653-5656.
- Virustatika: Historische Entwicklung der Chemotherapie von Viruserkrankungen. 2007. www.dkfz.de/spec/influenza/influenza/Virustatika.pdf.
- Wisniewski, M., M. Balakrishnan, C. Palaniappan, P. J. Fay, R. A. Bambara. 2000. Unique progressive cleavage mechanism of HIV reverse transcriptase RNase H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11978-11983.
- Wohrl, B. M., and K. Moelling. 1990. Interaction of HIV-1 ribonuclease H with polypurine tract containing RNA-DNA hybrids. *Biochemistry* 29:10141-10147.

Yap, S.H., C. W. Sheen, J. Fahey, M. Zanin, D. Tyssen, V. D. Lima, B. Wynhoven, M. Kuiper, N. Sluis-Cremer, R. Harrigan, G. Tachedjian. 2007. N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med.* 4(12):e335.

Yu, Q., M. Ottmann, C. Pechoux, G. S. Le, J. L. Darlix. 1998. Mutations in the primer grip of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase impair proviral DNA synthesis and virion maturation. *J Virol.* 72:7676-7680.

Zack, J. A., S. J. Arrigo, S. R. Weitsman, A. S. Go, A. Haislip, I. S. Chen. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61:213-222.

Zelina, S., C. W. Sheen, J. Radzio, J. W. Mellors, N. Sluis-Cremer. 2007. Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:157-163.

Anhang

A.1 PCR-Resultate, zwei Methoden

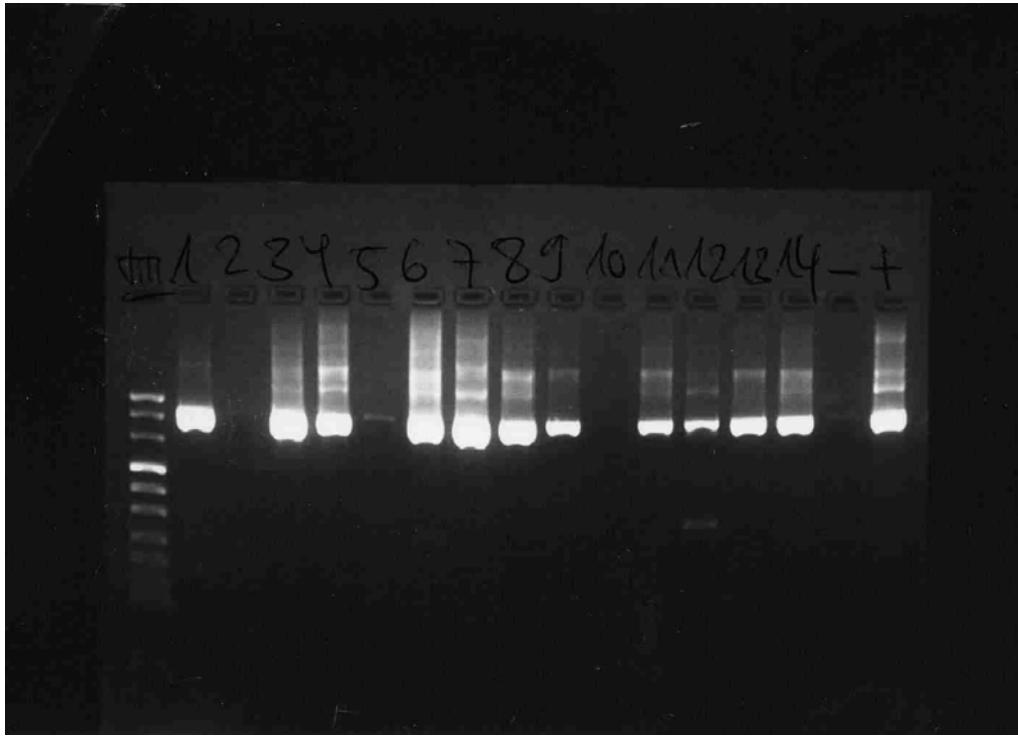


Abb. A.1: Primer Kombination (Mix 4); Position 1: Marker XVII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle

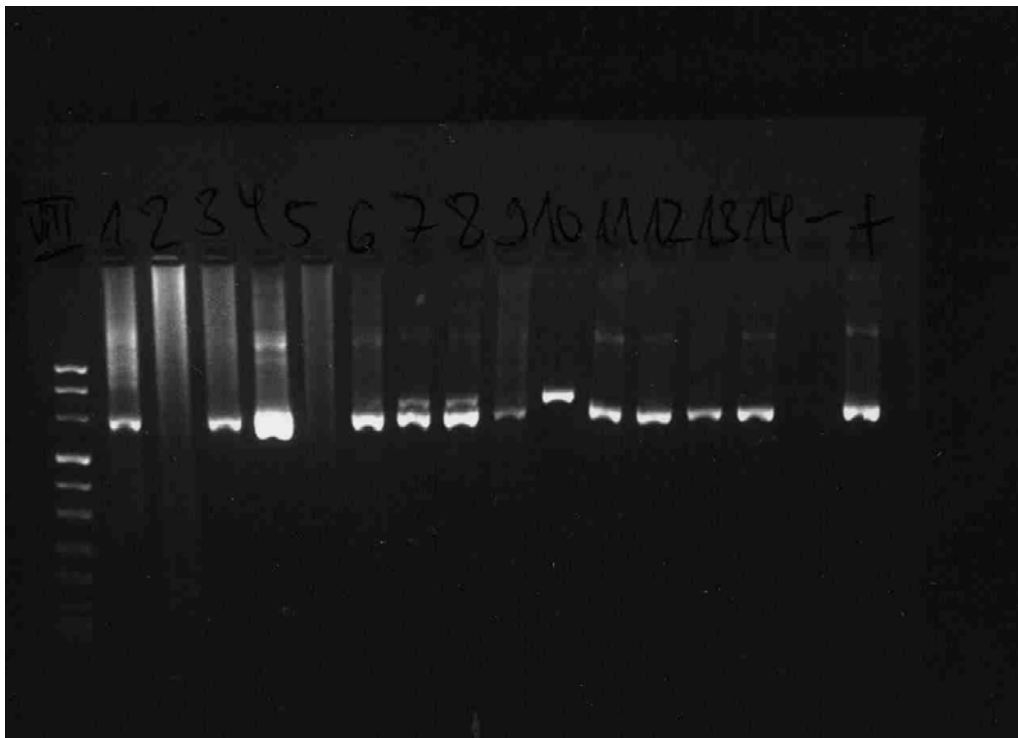


Abb. A.2: Primer Kombination (RNase A/RNase B (Mix 1)); Position 1: Marker VIII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle

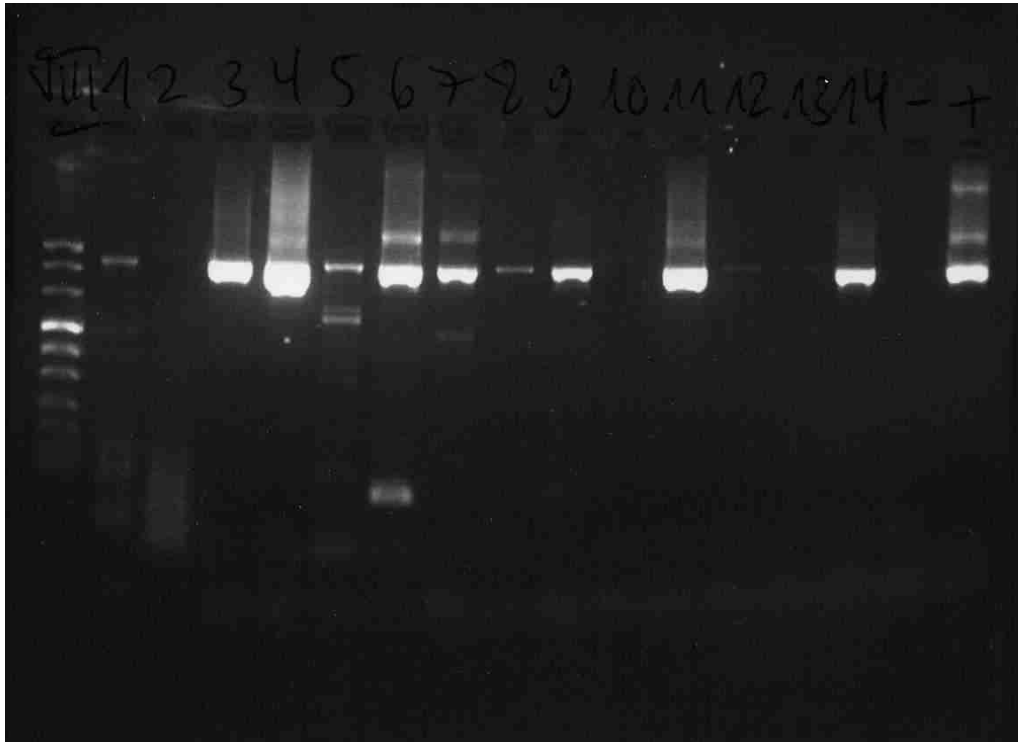


Abb. A.3: Primer Kombination (Mix 3)); Position 1: Marker VIII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle

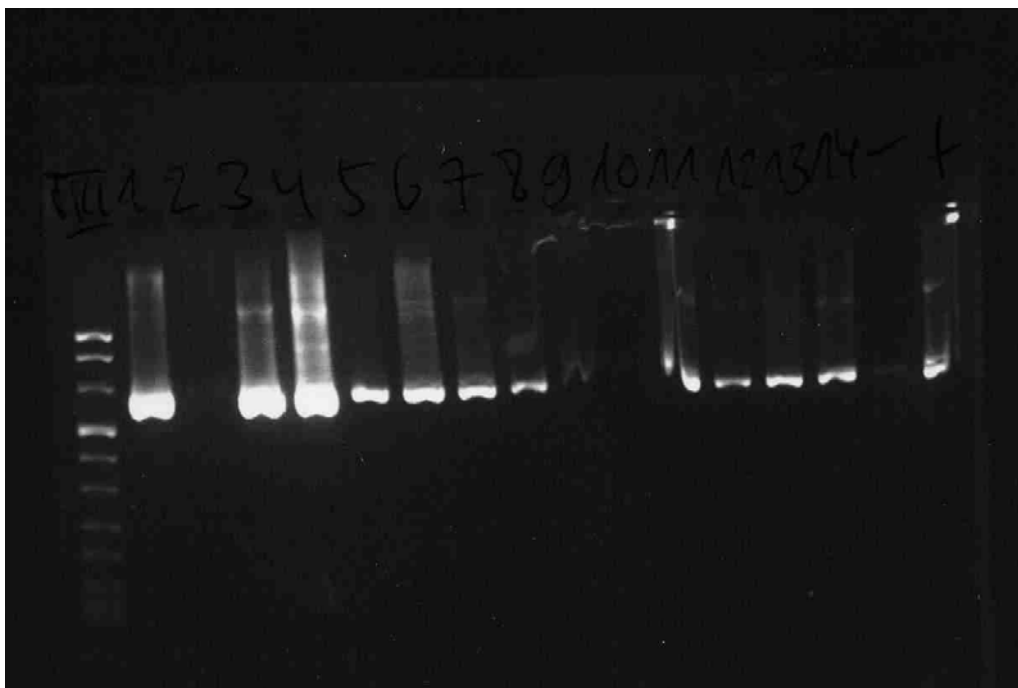


Abb. A.4: Primer Kombination (RNaseA/RNaseB (Mix 2)); Position 1: Marker VIII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle

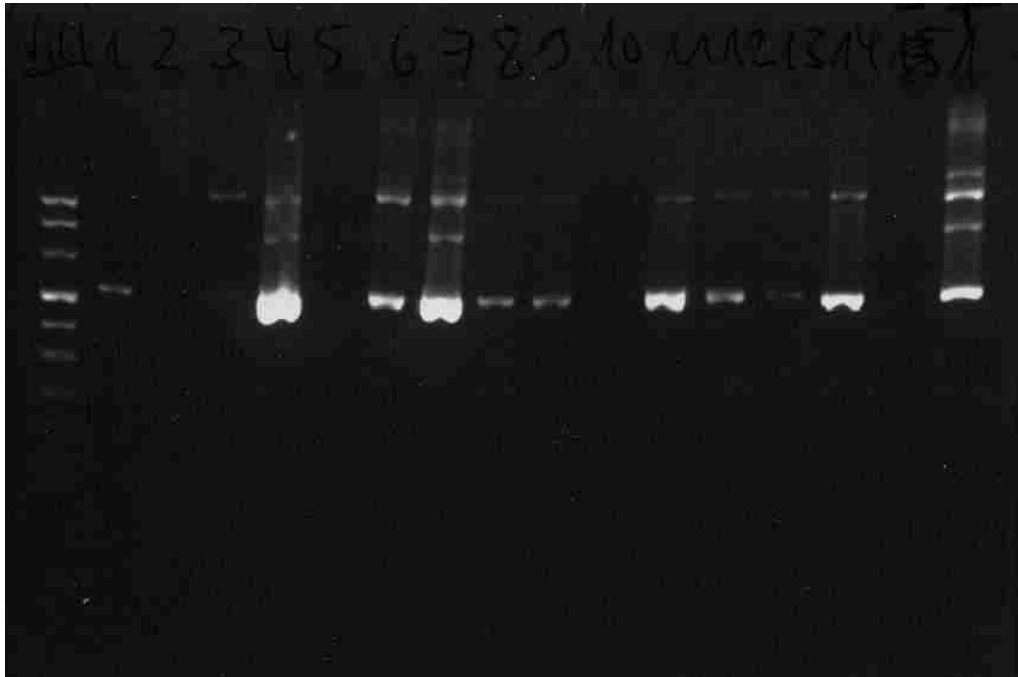


Abb. A.5: Primer Kombination (*cnrE/cnrF* (Mix 0)); Position 1: Marker VIII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle



Abb. A.6: Primer Kombination (*cnC₂/RNAseD* (Mix 5)); Position 1: Marker XVII, Positionen 2-14: Patientenproben, Position 15: Negativkontrolle, Position 16: Positivkontrolle

A.2 Komplette RT-Sequenzen aller Patienten

Seq./Positionen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Consensus_B(%)	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons16681_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons24615_B	P	I	T	P	I	D	P	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons07360_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons10695_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons63233_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons41431_B	X	X	X	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	L	D	G	P	K
cons11167_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons27744_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons12515_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons40494_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons12303_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons03386_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons14668_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons28718_B	X	X	X	X	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons31406_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons40599_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons30242_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons13675_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons42954_B	X	X	X	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons11430_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons36037_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons08109_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons20612_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons18249_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons25778_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons23218_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons22303_B	X	X	X	X	X	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons16480_B	P	I	S	P	L	K	P	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons13682_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons35306_B	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons11612_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons14450_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons09240_uB	P	I	I	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons10701_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons14720_uB	X	X	X	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons16994_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons15627_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons14667_uB	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons07553_uB.crf12	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons11315_uB	-	-	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K

Seq./Positionen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Consensus_B(%)	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons16681_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	E
cons24615_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons07360_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons10695_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	E
cons63233_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	V	L	I	E	I	C	T	E
cons41431_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E
cons11167_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E
cons27744_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	M	E	I	C	T	E
cons12515_B	X	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	T	A	L	V	E	I	C	T	E
cons40494_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	A	E
cons12303_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons03386_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons14668_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons28718_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	R	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons31406_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	L	E	I	C	T	E
cons40599_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	A	E
cons30242_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons13675_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons42954_B	S	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E
cons11430_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons36037_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons08109_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons20612_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons18249_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons25778_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons23218_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	R	A	L	I	E	I	C	T	E
cons22303_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons16480_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons13682_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons35306_B	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	E
cons11612_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons14450_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E
cons09240_uB	V	K	Q	W	P	L	T	A	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E
cons10701_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons14720_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons16994_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons15627_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons14667_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons07553_uB.crf12	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	V	E	I	C	T	E
cons11315_uB	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	I	E	I	C	T	E

Seq./Positionen	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Consensus_B(%)	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons16681_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons24615_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons07360_B	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons10695_B	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons63233_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons41431_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons11167_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons27744_B	L	E	A	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons12515_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons40494_B	L	E	E	E	G	K	I	S	R	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons12303_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons03386_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons14668_B	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons28718_B	L	E	K	D	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons31406_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons40599_B	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons30242_B	L	E	K	D	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons13675_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons42954_B	L	E	E	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons11430_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons36037_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons08109_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons20612_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons18249_B	M	E	K	E	G	Q	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons25778_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons23218_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons22303_B	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons16480_B	L	E	K	D	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons13682_B	L	E	E	A	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons35306_B	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons11612_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons14450_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons09240_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons10701_uB	M	E	R	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons14720_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons16994_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons15627_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons14667_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons07553_uB.crf12	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons11315_uB	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V

Seq./Positionen	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Consensus_B(%)	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons16681_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons24615_B	F	A	I	K	K	K	N	S	P	R	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons07360_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons10695_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons63233_B	F	A	I	K	K	K	N	S	D	R	W	R	K	L	I	D	F	R	E	L
cons41431_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons11167_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons27744_B	F	A	I	K	K	K	D	S	D	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons12515_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons40494_B	F	A	I	K	K	K	D	G	T	K	W	R	K	V	V	D	F	R	E	L
cons12303_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	I	V	D	F	R	E	L
cons03386_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons14668_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons28718_B	F	A	I	K	K	K	N	S	D	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons31406_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons40599_B	F	A	I	K	K	K	N	S	T	K	W	R	K	I	V	D	F	R	E	L
cons30242_B	F	A	I	K	K	K	D	G	I	K	W	R	K	V	X	D	F	R	E	L
cons13675_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons42954_B	F	A	I	K	K	K	N	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons11430_B	F	A	I	K	K	K	D	S	N	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons36037_B	F	A	I	K	K	K	D	S	N	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons08109_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons20612_B	F	A	I	K	K	K	N	S	T	R	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons18249_B	F	A	I	K	K	K	D	S	A	E	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons25778_B	F	A	I	K	R	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons23218_B	F	A	I	K	R	K	N	G	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons22303_B	F	A	I	K	R	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons16480_B	F	A	I	K	K	K	N	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons13682_B	F	V	I	K	K	K	G	T	D	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons35306_B	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons11612_uB	F	A	I	K	K	K	D	T	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons14450_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons09240_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons10701_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons14720_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons16994_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons15627_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons14667_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons07553_uB.crf12	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L
cons11315_uB	F	A	I	K	K	K	D	S	T	K	W	R	K	L	V	D	F	R	E	L

Seq./Positionen	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Consensus_B(%)	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons16681_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons24615_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons07360_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons10695_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons63233_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons41431_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons11167_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons27744_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons12515_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons40494_B	N	N	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons12303_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons03386_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons14668_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons28718_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	G	G	L
cons31406_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons40599_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons30242_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons13675_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons42954_B	N	K	K	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons11430_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons36037_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons08109_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons20612_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons18249_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons25778_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons23218_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons22303_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	G	G	L
cons16480_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons13682_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	G	G	L
cons35306_B	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons11612_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons14450_uB	N	K	K	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons09240_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons10701_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons14720_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons16994_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	S	G	L
cons15627_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons14667_uB	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	I	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons07553_uB.crf12	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons11315_uB	N	K	K	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L

Seq./Positionen	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Consensus_B(%)	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons16681_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons24615_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons07360_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons10695_B	E	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons63233_B	T	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	Y	S	V	P	L
cons41431_B	K	K	N	K	S	I	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons11167_B	K	R	N	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons27744_B	K	R	S	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons12515_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons40494_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons12303_B	K	K	N	K	S	V	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons03386_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons14668_B	K	K	K	R	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons28718_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons31406_B	K	K	N	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons40599_B	K	K	N	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons30242_B	K	Q	N	K	S	V	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons13675_B	K	K	K	K	S	I	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons42954_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons11430_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons36037_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons08109_B	K	K	K	K	S	V	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons20612_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons18249_B	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons25778_B	Q	K	N	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons23218_B	K	K	N	K	S	I	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons22303_B	E	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons16480_B	K	K	N	K	S	V	T	V	L	D	I	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons13682_B	E	K	K	K	S	I	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons35306_B	E	K	K	K	S	I	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	I	P	L
cons11612_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons14450_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons09240_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons10701_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons14720_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons16994_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons15627_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons14667_uB	K	K	K	N	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons07553_uB.crf12	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons11315_uB	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L

Seq./Positionen	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Consensus_B(%)	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons16681_B	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons24615_B	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons07360_B	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons10695_B	D	E	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons63233_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons41431_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons11167_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons27744_B	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons12515_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons40494_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons12303_B	D	P	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons03386_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	L	N	N	E	T	P
cons14668_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons28718_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons31406_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons40599_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons30242_B	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons13675_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons42954_B	D	P	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons11430_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons36037_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons08109_B	D	E	N	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons20612_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons18249_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons25778_B	D	E	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons23218_B	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons22303_B	D	E	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons16480_B	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	M	P
cons13682_B	D	E	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons35306_B	D	E	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons11612_uB	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons14450_uB	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons09240_uB	H	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons10701_uB	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons14720_uB	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons16994_uB	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons15627_uB	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	A	T	P
cons14667_uB	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons07553_uB.crf12	D	K	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P
cons11315_uB	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P

Seq./Positionen	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Consensus_B(%)	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons16681_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons24615_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons07360_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons10695_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons63233_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	M	G	W	K	G	S	P	S	I	F
cons41431_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons11167_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons27744_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons12515_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons40494_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons12303_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons03386_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons14668_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons28718_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons31406_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons40599_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons30242_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons13675_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons42954_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons11430_B	G	T	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons36037_B	G	T	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons08109_B	G	V	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	T	I	F
cons20612_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons18249_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons25778_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons23218_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	M	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons22303_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons16480_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons13682_B	G	V	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons35306_B	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons11612_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons14450_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons09240_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons10701_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons14720_uB	G	V	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons16994_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons15627_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons14667_uB	G	Q	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons07553_uB.crf12	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons11315_uB	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F

Seq./Positionen	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Consensus_B(%)	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons16681_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons24615_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons07360_B	Q	S	S	M	T	R	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons10695_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons63233_B	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons41431_B	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	L	V	I
cons11167_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	E	Q	N	P	D	I	V	I
cons27744_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	I	I
cons12515_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons40494_B	Q	D	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	I	I
cons12303_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	I	V	I
cons03386_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons14668_B	Q	S	S	M	T	R	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	I	V	I
cons28718_B	Q	N	S	M	T	E	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons31406_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons40599_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons30242_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons13675_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	D	I
cons42954_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	L	V	I
cons11430_B	Q	A	S	M	I	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons36037_B	Q	A	S	M	I	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons08109_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	M	V	I
cons20612_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons18249_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons25778_B	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons23218_B	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons22303_B	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	I	V	I
cons16480_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	N	K	N	P	D	M	V	I
cons13682_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	I	I
cons35306_B	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons11612_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons14450_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	I	I
cons09240_uB	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	E	I	V	I
cons10701_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons14720_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons16994_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	L	V	I
cons15627_uB	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	E	Q	N	P	D	M	I	I
cons14667_uB	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	I	V	I
cons07553_uB.crf12	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	G	I	V	I
cons11315_uB	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	K	Q	N	P	D	M	V	I

Seq./Positionen	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Consensus_B(%)	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons16681_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	E
cons24615_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	I
cons07360_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons10695_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	L	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons63233_B	C	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	S	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons41431_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	A
cons11167_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	T
cons27744_B	C	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons12515_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons40494_B	C	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons12303_B	C	Q	Y	I	D	D	L	H	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	T
cons03386_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons14668_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons28718_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons31406_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons40599_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	K
cons30242_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	A
cons13675_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	L	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons42954_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	K
cons11430_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons36037_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons08109_B	C	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	A
cons20612_B	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons18249_B	C	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons25778_B	C	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons23218_B	C	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	A	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons22303_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	S	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons16480_B	Y	Q	Y	I	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	T
cons13682_B	C	Q	Y	I	D	D	L	Y	V	A	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons35306_B	Y	Q	Y	M	D	D	L	L	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons11612_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	T
cons14450_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons09240_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	A
cons10701_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons14720_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	I
cons16994_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons15627_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons14667_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons07553_uB.crf12	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons11315_uB	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T

Seq./Positionen	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
Consensus_B(%)	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons16681_B	K	V	E	E	L	R	K	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons24615_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	G	W	G	F	I	T	P	D	Q	K
cons07360_B	K	V	E	A	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	F	L	T	P	D	K	K
cons10695_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons63233_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	F	F	T	P	E	Q	K
cons41431_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons11167_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons27744_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	W	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons12515_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	G	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons40494_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons12303_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons03386_B	K	I	E	E	L	R	T	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons14668_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons28718_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	W	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons31406_B	K	I	E	E	L	R	T	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons40599_B	K	I	E	E	L	R	Q	Y	L	L	R	W	G	F	V	T	P	E	Q	K
cons30242_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	W	R	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons13675_B	K	I	D	E	L	R	Q	H	L	W	R	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons42954_B	R	I	E	E	L	R	E	H	L	W	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons11430_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	R	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons36037_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	R	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons08109_B	K	I	E	K	L	R	Q	H	L	L	S	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons20612_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	I	T	P	D	E	K
cons18249_B	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	K	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons25778_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons23218_B	K	V	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	E	K
cons22303_B	K	I	E	K	L	R	E	H	L	L	R	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons16480_B	K	I	K	E	L	R	K	Y	L	W	D	W	G	F	Y	T	P	D	R	K
cons13682_B	K	I	E	E	L	R	Q	Y	L	W	K	W	G	F	Y	T	P	D	R	K
cons35306_B	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	K	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons11612_uB	K	I	E	E	L	R	E	H	L	L	R	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons14450_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	Q	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons09240_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	T	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons10701_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	R	W	G	L	T	T	P	D	K	K
cons14720_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons16994_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons15627_uB	K	I	E	E	L	R	K	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons14667_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	Q	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons07553_uB.crf12	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons11315_uB	K	I	E	E	L	R	Q	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K

Seq./Positionen	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Consensus_B(%)	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons16681_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons24615_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons07360_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons10695_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons63233_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons41431_B	H	Q	K	E	P	P	F	R	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons11167_B	H	Q	K	E	H	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons27744_B	H	Q	K	E	P	P	F	R	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons12515_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons40494_B	Y	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons12303_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons03386_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons14668_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons28718_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons31406_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons40599_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons30242_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons13675_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	V	L	H	P	D	K	W	T
cons42954_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons11430_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons36037_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons08109_B	Y	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons20612_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons18249_B	Y	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons25778_B	H	Q	K	E	P	P	F	H	W	M	G	Y	E	I	H	P	D	K	W	T
cons23218_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons22303_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons16480_B	H	Q	E	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons13682_B	H	Q	Q	E	P	P	F	H	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons35306_B	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons11612_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons14450_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons09240_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons10701_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons14720_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons16994_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons15627_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons14667_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons07553_uB.crf12	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons11315_uB	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T

Seq./Positionen	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Consensus_B(%)	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons16681_B	V	Q	P	I	Q	L	P	D	K	E	C	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons24615_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons07360_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	I	N	D	I	Q	K	L
cons10695_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons63233_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons41431_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons11167_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons27744_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons12515_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons40494_B	V	Q	P	I	T	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons12303_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons03386_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons14668_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons28718_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons31406_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons40599_B	V	Q	P	I	M	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons30242_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons13675_B	V	Q	P	I	Q	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons42954_B	V	Q	P	I	V	L	P	D	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons11430_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons36037_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons08109_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons20612_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons18249_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons25778_B	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons23218_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons22303_B	V	Q	P	I	T	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons16480_B	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons13682_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons35306_B	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	-	K	L
cons11612_uB	V	Q	P	I	V	L	P	E	Q	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons14450_uB	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	I	N	D	I	Q	K	L
cons09240_uB	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons10701_uB	V	Q	P	I	A	L	P	D	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons14720_uB	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons16994_uB	V	Q	P	I	Q	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons15627_uB	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons14667_uB	V	Q	P	V	V	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons07553_uB.crf12	V	Q	P	I	V	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons11315_uB	V	Q	P	I	Q	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L

Seq./Positionen	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
Consensus_B(%)	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons16681_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	-	-	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons24615_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons07360_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons10695_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons63233_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	H	L	C
cons41431_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons11167_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons27744_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons12515_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons40494_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons12303_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons03386_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	H	L	C
cons14668_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	E	L	C
cons28718_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons31406_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	H	L	C
cons40599_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons30242_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons13675_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons42954_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons11430_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons36037_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons08109_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons20612_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons18249_B	V	G	K	L	N	W	A	S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons23218_B	V	G	K	L	D	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	H	L	C
cons22303_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons16480_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons13682_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons35306_B	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons11612_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons14450_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	H	L	C
cons09240_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons10701_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons14720_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons16994_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons15627_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons14667_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons07553_uB.crf12	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons11315_uB	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C

Seq./Positionen	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
Consensus_B(%)	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	E	E	A	E
cons16681_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	D	I	V	P	L	T	A	E	A	E
cons24615_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	E	E	A	E
cons07360_B	K	L	L	R	G	T	K	S	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons10695_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons63233_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons41431_B	K	L	I	R	G	T	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	K	E	A	E
cons11167_B	R	L	L	R	G	T	K	S	L	T	E	V	I	P	L	S	K	E	A	E
cons27744_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons12515_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons40494_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons12303_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons03386_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	V	E	A	E
cons14668_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	K	E	A	E
cons28718_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	I	V	P	L	T	K	E	A	E
cons31406_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	V	E	A	E
cons40599_B	K	L	I	R	G	T	K	S	L	T	E	V	V	T	L	T	K	E	A	E
cons30242_B	K	L	L	K	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons13675_B	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	K	E	A	E
cons42954_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons11430_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	S	E	E	A	E
cons36037_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	S	E	E	A	E
cons08109_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	E	E	A	E
cons20612_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	K	L	I	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	S	F	T	E	E	A	E
cons23218_B	K	L	L	R	G	T	K	A	V	T	E	V	V	P	L	T	V	E	A	E
cons22303_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	I	T	L	T	T	E	A	E
cons16480_B	R	L	L	K	G	A	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	K	E	A	E
cons13682_B	K	L	L	R	G	T	K	S	L	T	D	V	I	P	L	T	E	E	A	E
cons35306_B	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons11612_uB	K	L	L	R	G	A	R	A	L	T	E	V	V	P	L	T	K	E	A	E
cons14450_uB	R	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	T	E	A	E
cons09240_uB	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	D	V	V	T	L	T	R	E	A	E
cons10701_uB	K	L	L	R	G	T	K	S	L	T	E	V	V	T	L	T	A	E	A	E
cons14720_uB	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	E	A	E
cons16994_uB	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	E	V	I	P	L	T	K	E	A	E
cons15627_uB	K	L	L	R	G	A	K	S	L	T	E	V	I	P	L	T	K	E	A	E
cons14667_uB	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	T	L	T	R	E	A	E
cons07553_uB.crf12	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	E	V	V	S	L	T	R	E	A	E
cons11315_uB	K	L	L	K	G	A	K	A	L	T	E	V	V	P	L	T	E	G	A	E

Seq./Positionen	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
Consensus_B(%)	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E (97)	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons16681_B	L	E	L	A	E	D	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons24615_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	G	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons07360_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	Q	I	H	G	A	Y	Y	D
cons10695_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons63233_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons41431_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	A	V	H	G	V	Y	Y	D
cons11167_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons27744_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons12515_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons40494_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons12303_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons03386_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons14668_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons28718_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons31406_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons40599_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	F	Y	D
cons30242_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons13675_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	A	Y	Y	D
cons42954_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons11430_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons36037_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons08109_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	R	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons20612_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons23218_B	L	E	L	A	E	N	R	G	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons22303_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons16480_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	A	F	Y	D
cons13682_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	R	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons35306_B	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons11612_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons14450_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons09240_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons10701_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons14720_uB	L	E	L	A	E	N	R	D	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons16994_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons15627_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	R	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons14667_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	A	Y	Y	D
cons07553_uB.crf12	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons11315_uB	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D

Seq./Positionen	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
Consensus_B(%)	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G (88)	Q	G (95)	Q	W	T	Y	Q
cons16681_B	P	S	K	E	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	L	D	Q	W	T	Y	Q
cons24615_B	P	S	K	D	L	V	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons07360_B	P	T	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons10695_B	P	S	K	E	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons63233_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons41431_B	P	T	K	E	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	F	G	Q	W	T	Y	Q
cons11167_B	P	S	K	D	L	I	A	D	I	Q	K	Q	G	E	G	Q	W	T	Y	Q
cons27744_B	P	S	K	E	L	I	A	E	V	Q	K	Q	E	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons12515_B	P	S	K	D	L	V	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons40494_B	P	S	K	D	L	V	A	E	V	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons12303_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons03386_B	P	S	K	D	L	I	A	E	L	Q	K	Q	D	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons14668_B	P	S	K	D	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons28718_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	E	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons31406_B	P	S	K	D	L	I	A	E	L	Q	K	Q	D	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons40599_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	E	H	G	Q	W	T	Y	Q
cons30242_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons13675_B	P	S	K	D	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons42954_B	P	S	R	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	E	G	Q	W	T	Y	Q
cons11430_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons36037_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons08109_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	E	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons20612_B	P	S	K	D	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons23218_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	S	Q	W	T	Y	Q
cons22303_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons16480_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	T	Y	Q
cons13682_B	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons35306_B	P	S	K	E	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons11612_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons14450_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	L	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons09240_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons10701_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons14720_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	V	Q	K	Q	G	E	G	Q	W	T	Y	Q
cons16994_uB	P	S	K	E	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	E	G	Q	W	T	Y	Q
cons15627_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	L	G	Q	W	S	Y	Q
cons14667_uB	P	T	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	N	G	Q	W	S	Y	Q
cons07553_uB.crf12	P	T	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons11315_uB	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q

Seq./Positionen	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359*	360*
Consensus_B(%)	I	Y	Q	E	P	F	K	N (98)	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G (98)	A (87)
cons16681_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	R	R	T	A
cons24615_B	I	Y	Q	E	P	F	K	I	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons07360_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	S	A
cons10695_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons63233_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons41431_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	M	R	G	T
cons11167_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	A
cons27744_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	A
cons12515_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	M	R	G	A
cons40494_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	G	R	M	R	S	A
cons12303_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons03386_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	A
cons14668_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	T
cons28718_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	S	A
cons31406_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	A
cons40599_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	M	R	G	A
cons30242_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	T
cons13675_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	S	A
cons42954_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	S	A
cons11430_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	M	R	S	A
cons36037_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	M	R	S	A
cons08109_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons20612_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	T
cons23218_B	I	Y	Q	E	P	F	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cons22303_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons16480_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	S	A
cons13682_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons35306_B	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons11612_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons14450_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	T
cons09240_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons10701_uB	I	Y	Q	D	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	I	R	G	A
cons14720_uB	I	Y	Q	E	Q	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons16994_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons15627_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	A
cons14667_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	G	T
cons07553_uB.crf12	I	F	Q	E	P	Y	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	G	A
cons11315_uB	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	V	R	G	A

Seq./Positionen	361*	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
Consensus_B(%)	H (100)	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A (97)	V	Q	K	I	A (69) T (25)	T	E	S	I
cons16681_B	H	T	N	D	V	R	Q	L	A	E	V	V	Q	K	I	A	T	E	G	I
cons24615_B	H	T	N	D	I	K	Q	L	T	A	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons07360_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	T	T	E	S	I
cons10695_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons63233_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	V	A	Q	E	S	I
cons41431_B	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons11167_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	T	T	E	S	I
cons27744_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons12515_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	S	T	E	S	I
cons40494_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	A	E	V	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons12303_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons03386_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	V	T	E	S	I
cons14668_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	V	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons28718_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	V	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons31406_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	F	T	E	S	I
cons40599_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	V	V	Q	K	I	S	T	E	S	I
cons30242_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	Q	E	S	I
cons13675_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	I	V	Q	K	I	S	T	E	S	I
cons42954_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	V	V	Q	K	I	T	L	E	S	I
cons11430_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons36037_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons08109_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons20612_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	I	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons23218_B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cons22303_B	H	T	N	D	V	R	Q	L	A	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons16480_B	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons13682_B	H	T	N	D	I	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons35306_B	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons11612_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons14450_uB	H	T	N	D	I	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	T	T	E	S	I
cons09240_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	V	T	E	S	I
cons10701_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	V	V	Q	K	V	T	T	E	S	I
cons14720_uB	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons16994_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	Q	E	G	I
cons15627_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	S	S	E	S	I
cons14667_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons07553_uB.crf12	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	T	T	E	S	I
cons11315_uB	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	A	V	Q	K	I	A	T	E	S	I

Seq./Positionen	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390*	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
Consensus_B(%)	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K (74) R (26)	L	P	I	Q	K (98)	E (100)	T	W	E	A
cons16681_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	R	E	T	W	E	T
cons24615_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	R	E	T	W	D	A
cons07360_B	V	I	W	G	K	I	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons10695_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	R	T	W	E	T
cons63233_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	T	T	I	Q	K	E	T	W	D	A
cons41431_B	V	I	W	G	R	T	P	I	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	D	T
cons11167_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons27744_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons12515_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons40494_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons12303_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	K	T	W	E	Q
cons03386_B	V	I	W	G	K	A	P	R	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons14668_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons28718_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons31406_B	I	I	W	G	K	T	P	R	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons40599_B	V	I	W	G	K	I	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons30242_B	V	I	W	G	R	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	R	E	T	W	D	A
cons13675_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	D	T
cons42954_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons11430_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons36037_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons08109_B	V	L	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons20612_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	-	-	-	-	-	E	T
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons23218_B	-	-	-	G	K	T	P	K	F	-	-	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons22303_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons16480_B	V	I	W	E	K	T	P	K	L	K	L	P	I	L	K	E	T	W	E	T
cons13682_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons35306_B	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons11612_uB	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons14450_uB	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	D	T
cons09240_uB	V	I	W	G	K	T	P	R	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons10701_uB	V	I	W	G	K	I	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons14720_uB	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons16994_uB	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons15627_uB	V	I	W	G	-	I	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	R	T	W	E	T
cons14667_uB	V	I	W	G	K	T	P	R	F	R	I	P	I	H	A	K	E	R	G	T
cons07553_uB.crf12	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	I
cons11315_uB	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T

Seq./Positionen	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
Consensus_B(%)	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons16681_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	D	W	E	F	V	N	T	P
cons24615_B	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons07360_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons10695_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons63233_B	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons41431_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons11167_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	A	N	T	P
cons27744_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons12515_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons40494_B	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons12303_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	-	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons03386_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons14668_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons28718_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons31406_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons40599_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons30242_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	I	N	T	P
cons13675_B	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons42954_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons11430_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons36037_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons08109_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons20612_B	W	W	T	-	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons18249_B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
cons25778_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons23218_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	-	-	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons22303_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons16480_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons13682_B	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons35306_B	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons11612_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons14450_uB	W	W	T	E	Y	W	L	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons09240_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons10701_uB	W	W	V	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons14720_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons16994_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons15627_uB	W	W	T	-	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons14667_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons07553_uB.crf12	W	W	T	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons11315_uB	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P

Seq./Positionen	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
Consensus_B(%)	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons16681_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons24615_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	A	G	A	E	T	F
cons07360_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons10695_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons63233_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	T	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons41431_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons11167_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	T	E	A	E	T	F
cons27744_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	A	G	A	E	T	F
cons12515_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons40494_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons12303_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons03386_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons14668_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons28718_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons31406_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons40599_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	E	A	E	T	F
cons30242_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	R	E	P	I	A	G	A	E	T	F
cons13675_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons42954_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons11430_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons36037_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons08109_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	A	G	A	E	T	F
cons20612_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons18249_B	X	X	X	X	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	A	G	A	E	T	L
cons25778_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons23218_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	-	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons22303_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	T	G	A	E	T	F
cons16480_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons13682_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	A	G	A	E	T	F
cons35306_B	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons11612_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons14450_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons09240_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons10701_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons14720_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons16994_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons15627_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons14667_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons07553_uB.crf12	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	I	G	A	E	T	F
cons11315_uB	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F

Seq./Positionen	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
Consensus_B(%)	Y	V	D (99)	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons16681_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	D	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons24615_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons07360_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons10695_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	I	T	D
cons63233_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons41431_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons11167_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons27744_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	I	T	N
cons12515_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons40494_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons12303_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	S	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons03386_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons14668_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons28718_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	R	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons31406_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons40599_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons30242_B	Y	V	D	G	A	A	S	R	E	T	R	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons13675_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons42954_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons11430_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons36037_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons08109_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	D	T	K	L	G	R	A	G	Y	V	T	D
cons20612_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons18249_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	S	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons25778_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	R	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons23218_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	-	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons22303_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons16480_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	R	L	G	R	A	G	Y	I	T	N
cons13682_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons35306_B	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	I	T	D
cons11612_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons14450_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	S	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons09240_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	R	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons10701_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	S	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons14720_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	S	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons16994_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	R	A	G	Y	V	T	N
cons15627_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	N
cons14667_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	S	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons07553_uB.crf12	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	S	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons11315_uB	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	N

Seq./Positionen	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
Consensus_B(%)	R	G	R	Q	K	V	V	S	L (86) I (12)	T (74) N (10)	D	T	T (100)	N (100)	Q (100)	K (99)	T	E (100)	L	Q
cons16681_B	K	G	R	Q	K	V	V	T	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	E
cons24615_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons07360_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	R	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons10695_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	N	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons63233_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	P	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons41431_B	K	G	R	Q	K	V	I	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons11167_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons27744_B	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	A	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons12515_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons40494_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons12303_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons03386_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	P	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons14668_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	N	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons28718_B	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons31406_B	R	G	R	Q	K	V	I	S	L	P	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons40599_B	R	G	R	Q	K	A	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons30242_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons13675_B	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons42954_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons11430_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons36037_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons08109_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons20612_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	I	N	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons18249_B	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons25778_B	K	G	R	Q	K	V	I	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons23218_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	-	-	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons22303_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons16480_B	R	G	R	Q	K	V	I	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons13682_B	R	G	R	Q	K	S	I	S	L	N	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons35306_B	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	N	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons11612_uB	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons14450_uB	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons09240_uB	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons10701_uB	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons14720_uB	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons16994_uB	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	S
cons15627_uB	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q
cons14667_uB	R	G	R	Q	K	V	V	P	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons07553_uB.crf12	K	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	D	T	T	N	Q	K	A	E	L	Q
cons11315_uB	K	G	R	Q	K	V	V	T	L	T	D	T	T	N	Q	K	T	E	L	H

Seq./Positionen	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
Consensus_B(%)	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D (100)	S	Q
cons16681_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons24615_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons07360_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons10695_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons63233_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons41431_B	A	I	Q	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons11167_B	A	I	L	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons27744_B	A	I	N	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons12515_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons40494_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons12303_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons03386_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons14668_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons28718_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons31406_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons40599_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons30242_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons13675_B	A	I	Q	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons42954_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons11430_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons36037_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons08109_B	A	V	C	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons20612_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons18249_B	A	V	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons25778_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons23218_B	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	-	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons22303_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	S	D	S	Q
cons16480_B	A	I	N	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons13682_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons35306_B	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons11612_uB	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons14450_uB	A	I	L	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons09240_uB	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons10701_uB	A	I	H	L	A	C	R	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons14720_uB	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	P	E	A	N	I	V	T	D	S	Q
cons16994_uB	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons15627_uB	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons14667_uB	A	V	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons07553_uB.crf12	A	V	H	M	A	L	Q	D	S	G	P	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons11315_uB	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	L	E	V	N	I	V	T	D	S	Q

Seq./Positionen	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
Consensus_B(%)	Y (100)	A	L	G	I (99)	I	Q	A	Q (96)	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons16681_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons24615_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons07360_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons10695_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons63233_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	H	P	D	R	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons41431_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons11167_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	I	V	N	Q
cons27744_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons12515_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons40494_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons12303_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	T	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons03386_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons14668_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	K	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons28718_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons31406_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons40599_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons30242_B	Y	A	L	G	I	I	H	A	L	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons13675_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons42954_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons11430_B	Y	A	L	G	I	L	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons36037_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons08109_B	Y	T	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons20612_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons18249_B	Y	V	L	G	I	I	Q	A	Q	-	-	K	S	E	S	E	I	V	S	Q
cons25778_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons23218_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	-	-	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons22303_B	Y	A	I	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons16480_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons13682_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons35306_B	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons11612_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	K	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	N
cons14450_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	I	V	N	Q
cons09240_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	I	V	N	Q
cons10701_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	V	V	S	Q
cons14720_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	I	V	S	Q
cons16994_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons15627_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons14667_uB	Y	V	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	I	V	S	Q
cons07553_uB.crf12	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	Q
cons11315_uB	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	Q	S	E	S	E	L	V	S	Q

Seq./Positionen	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
Consensus_B(%)	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H (100)	K
cons16681_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons24615_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	I	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons07360_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons10695_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	D	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons63233_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	I	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons41431_B	I	I	E	E	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons11167_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	D	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons27744_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons12515_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons40494_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons12303_B	I	I	E	E	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons03386_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons14668_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	R	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons28718_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons31406_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	E	K	V	Y	T	A	W	V	P	A	H	K
cons40599_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons30242_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons13675_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	R	V	Y	L	A	W	V	P	S	H	K
cons42954_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons11430_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons36037_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons08109_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons20612_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons18249_B	I	I	E	E	L	I	K	K	E	-	-	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons25778_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons23218_B	I	I	E	Q	L	I	Q	K	E	-	-	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons22303_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	T	W	V	P	A	H	K
cons16480_B	I	I	E	E	L	I	K	K	E	R	V	Y	L	T	W	V	P	S	H	K
cons13682_B	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons35306_B	I	I	E	Q	L	I	N	K	D	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons11612_uB	I	I	E	Q	L	I	N	K	K	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons14450_uB	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	R	H	K
cons09240_uB	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons10701_uB	I	I	E	Q	L	I	N	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons14720_uB	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons16994_uB	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons15627_uB	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons14667_uB	I	I	E	E	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons07553_uB.crf12	I	I	E	Q	L	I	K	K	E	Q	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K
cons11315_uB	I	I	E	E	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	A	W	V	P	A	H	K

Seq./Positionen	541	542	543	544	545	546	547	548	549*	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
Consensus_B(%)	G	I	G	G	N	E	Q	V	D (100)	K	L	V	S	A (70) S (19)	G	I	R	K (95) R (6)	V	L
cons16681_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons24615_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons07360_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons10695_B	G	I	G	G	N	E	Q	I	D	K	L	V	S	T	G	I	R	R	V	L
cons63233_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons41431_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons11167_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons27744_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons12515_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons40494_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	R	V	L
cons12303_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons03386_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons14668_B	G	I	G	G	N	E	Q	I	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons28718_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons31406_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons40599_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons30242_B	G	I	G	G	N	E	K	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons13675_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons42954_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons11430_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	R	V	L
cons36037_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	R	V	L
cons08109_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons20612_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons18249_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	-	-	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons25778_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	I	-
cons23218_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	-	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons22303_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons16480_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons13682_B	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons35306_B	G	I	G	G	N	E	Q	I	D	K	L	V	S	T	G	I	R	R	V	L
cons11612_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons14450_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons09240_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons10701_uB	G	M	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons14720_uB	G	I	G	G	N	E	P	I	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons16994_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	A	G	I	R	K	V	L
cons15627_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons14667_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons07553_uB.crf12	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	T	G	I	R	K	V	L
cons11315_uB	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L

Tab. A.1: Alle Positionen der Reversen Transkriptase von HIV-1 für Subtyp B (Polymerase, Connection und RNase H). Jeweils erste Zeile: Positionen, wie sie in der balancierten Consensus-Sequenz für Subtyp B am häufigsten vorkommen (Prozentangaben nur für relevante Positionen). Linke Spalte: Patientensequenzen.

Seq.= Sequenzen; B = Subtyp B, behandelt; uB = Subtyp B, unbehandelt.

gelb: Finger-Mutationen (inklusive TAMs),

rosa: Mutationen unter NNRTI-Therapie,

blau: Mutation an M184V,

grau: Q151M (Multi drug resistance),

grün: Primer Grip-Positionen,

violett: aktives Zentrum der RNase H,

rot: relevante Positionen der Connection und RNase H-Domänen, die in der aktuellen Literatur beschrieben sind.

* Positionen 359,360, 361 und 390 gehören dem Primer Grip an, Position 549 dem aktiven Zentrum der RNase H.

Seq./Positionen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Consensus_A (%)	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons30845_A Insertion	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R
cons13205_A1	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons35195_AE_pol	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	T	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons14719_uA (crf_AE)	X	X	X	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons11168_uA (AG_A1)	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons01717_crf_06	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	K
cons26478_Mosaik	P	I	S	P	I	E	T	V	P	V	K	L	K	P	G	M	D	G	P	R

Seq./Positionen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Consensus_A (%)	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	E
cons30845_A Insertion	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	M	E
cons13205_A1	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	D
cons35195_AE_pol	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	K	E
cons14719_uA (crf_AE)	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	R	E
cons11168_uA (AG_A1)	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	T	E
cons01717_crf_06	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	G	E
cons26478_Mosaik	V	K	Q	W	P	L	T	E	E	K	I	K	A	L	T	E	I	C	L	E

Seq./Positionen	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Consensus_A (%)	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons30845_A Insertion	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons13205_A1	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons35195_AE_pol	M	E	E	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons14719_uA (crf_AE)	M	E	E	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons11168_uA (AG_A1)	M	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	V
cons01717_crf_06	L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I
cons26478_Mosaik	L	E	K	D	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N	T	P	I

Seq./Positionen	61	62	63	64	65	66	67	68	69	Ins	Ins	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Consensus_A (%)	F	A	I	K	K	K	D	S	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R
cons30845_A Insertion	F	A	I	K	K	K	G	S	S	E	G	K	W	R	K	V	V	D	F	R
cons13205_A1	F	A	I	K	K	K	N	S	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R
cons35195_AE_pol	F	A	I	K	K	K	D	S	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R
cons14719_uA (crf_AE)	F	A	I	K	K	K	D	S	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R
cons11168_uA (AG_A1)	F	A	I	K	K	K	D	S	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R
cons01717_crf_06	F	A	I	K	K	K	N	S	T	-	-	R	W	R	K	L	V	D	F	R
cons26478_Mosaik	F	A	I	K	K	K	G	G	T	-	-	K	W	R	K	L	V	D	F	R

Seq./Positionen	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Consensus_A (%)	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons30845_A Insertion	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	G	G	L
cons13205_A1	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons35195_AE_pol	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons14719_uA (crf_AE)	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons11168_uA (AG_A1)	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons01717_crf_06	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L
cons26478_Mosaik	N	K	R	T	Q	D	F	W	E	V	Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L

Seq./Positionen	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Consensus_A (%)	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons30845_A Insertion	E	K	K	K	S	V	T	I	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons13205_A1	K	K	N	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons35195_AE_pol	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons14719_uA (crf_AE)	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons11168_uA (AG_A1)	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons01717_crf_06	E	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L
cons26478_Mosaik	K	K	K	K	S	V	T	V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	L

Seq./Positionen	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Consensus_A (%)	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons30845_A Insertion	D	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	A	T	P
cons13205_A1	H	E	D	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons35195_AE_pol	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons14719_uA (crf_AE)	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons11168_uA (AG_A1)	D	E	S	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	T	N	N	E	T	P
cons01717_crf_06	D	E	N	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	V	N	N	E	T	P
cons26478_Mosaik	D	K	E	F	R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	I	N	N	E	T	P

Seq./Positionen	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Consensus_A (%)	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons30845_A Insertion	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons13205_A1	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons35195_AE_pol	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons14719_uA (crf_AE)	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons11168_uA (AG_A1)	G	V	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons01717_crf_06	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F
cons26478_Mosaik	G	I	R	Y	Q	Y	N	V	L	P	Q	G	W	K	G	S	P	A	I	F

Seq./Positionen	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Consensus_A (%)	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	S	K	N	P	E	I	I	I
cons30845_A Insertion	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	Y	R	S	K	N	P	E	I	I	I
cons13205_A1	Q	C	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	L	K	N	P	E	I	I	I
cons35195_AE_pol	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	I	K	N	P	E	I	I	I
cons14719_uA (crf_AE)	Q	G	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	L	K	N	P	E	I	V	I
cons11168_uA (AG_A1)	Q	H	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	A	K	N	P	D	I	I	I
cons01717_crf_06	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	R	S	R	N	P	E	M	V	I
cons26478_Mosaik	Q	S	S	M	T	K	I	L	E	P	F	K	T	K	N	P	E	L	V	I

Seq./Positionen	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Consensus_A (%)	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons30845_A Insertion	C	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	A	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	K
cons13205_A1	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	A
cons35195_AE_pol	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	I
cons14719_uA (crf_AE)	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons11168_uA (AG_A1)	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T
cons01717_crf_06	Y	Q	Y	V	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	E	Q	H	R	A
cons26478_Mosaik	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	S	D	L	E	I	G	E	H	R	T

Seq./Positionen	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
Consensus_A (%)	K	I	E	E	L	R	A	H	L	L	S	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons30845_A Insertion	K	I	E	E	L	R	A	H	L	L	S	W	G	F	Y	T	P	D	K	K
cons13205_A1	K	I	E	E	L	R	A	H	L	L	S	W	G	F	V	T	P	E	Q	K
cons35195_AE_pol	K	I	E	E	L	R	N	H	L	L	S	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons14719_uA (crf_AE)	K	I	E	E	L	R	A	H	L	L	S	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons11168_uA (AG_A1)	K	I	E	E	L	R	A	H	L	L	K	W	G	F	T	T	P	D	K	K
cons01717_crf_06	K	I	E	E	L	R	D	H	L	L	K	W	G	F	F	T	P	D	E	K
cons26478_Mosaik	K	I	K	E	L	R	E	Y	L	W	K	W	G	F	Y	T	P	D	D	K

Seq./Positionen	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Consensus_A (%)	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons30845_A Insertion	Y	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons13205_A1	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons35195_AE_pol	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	R	W	T
cons14719_uA (crf_AE)	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons11168_uA (AG_A1)	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons01717_crf_06	H	Q	K	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T
cons26478_Mosaik	H	Q	E	E	P	P	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T

Seq./Positionen	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Consensus_A (%)	V	Q	P	I	Q	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons30845_A Insertion	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons13205_A1	V	Q	P	I	E	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons35195_AE_pol	V	Q	P	I	K	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons14719_uA (crf_AE)	V	Q	P	I	M	L	P	D	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons11168_uA (AG_A1)	V	Q	P	I	Q	L	P	E	K	D	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons01717_crf_06	V	Q	P	V	T	L	P	E	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L
cons26478_Mosaik	V	Q	T	I	Q	L	P	D	K	E	S	W	T	V	N	D	I	Q	K	L

Seq./Positionen	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
Consensus_A (%)	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons30845_A Insertion	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons13205_A1	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	G	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons35195_AE_pol	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	A	G	I	K	V	R	Q	L	C
cons14719_uA (crf_AE)	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons11168_uA (AG_A1)	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons01717_crf_06	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C
cons26478_Mosaik	V	G	K	L	N	W	A	S	Q	I	Y	P	G	I	K	V	K	Q	L	C

Seq./Positionen	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
Consensus_A (%)	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	D	I	V	T	L	T	E	E	A	E
cons30845_A Insertion	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	D	I	V	P	L	T	E	E	A	E
cons13205_A1	R	L	L	R	G	A	K	A	L	T	D	I	V	T	L	T	E	E	A	E
cons35195_AE_pol	R	L	L	R	G	A	K	A	L	T	D	I	V	P	L	T	E	E	A	E
cons14719_uA (crf_AE)	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	D	I	V	T	L	T	E	E	A	E
cons11168_uA (AG_A1)	R	L	L	R	G	T	K	A	L	T	D	I	V	T	L	T	E	E	A	E
cons01717_crf_06	K	L	L	R	G	T	K	A	L	T	D	I	V	P	L	T	A	E	A	E
cons26478_Mosaik	K	L	L	R	G	A	K	A	L	T	D	I	V	P	L	T	A	E	A	E

Seq./Positionen	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
Consensus_A (%)	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	D (62), E (28)	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons30845_A Insertion	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons13205_A1	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	A	Y	Y	D
cons35195_AE_pol	L	E	L	E	E	N	R	E	I	L	K	T	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons14719_uA (crf_AE)	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	G	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons11168_uA (AG_A1)	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	D	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons01717_crf_06	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	R	E	P	V	H	G	V	Y	Y	D
cons26478_Mosaik	L	E	L	A	E	N	R	E	I	L	K	E	P	V	H	G	A	Y	Y	D

Seq./Positionen	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
Consensus_A (%)	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G (100)	Q	D (92)	Q	W	T	Y	Q
cons30845_A Insertion	P	S	K	D	L	V	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	E	Q	W	T	Y	Q
cons13205_A1	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	D	Q	W	T	Y	Q
cons35195_AE_pol	P	S	K	D	L	V	A	E	V	Q	K	Q	G	Q	D	Q	W	T	Y	Q
cons14719_uA (crf_AE)	P	S	K	D	L	V	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	D	Q	W	T	Y	Q
cons11168_uA (AG_A1)	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	D	Q	W	T	Y	Q
cons01717_crf_06	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q
cons26478_Mosaik	P	S	K	D	L	I	A	E	I	Q	K	Q	G	Q	G	Q	W	T	Y	Q

Seq./Positionen	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359*	360*
Consensus_A (%)	I	Y	Q	E	P	F	K	N (100)	L	K	T	G	K	Y	A	R	K	R	S (99)	A (85) T (12)
cons30845_A Insertion	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	R	T	G	K	Y	A	K	R	R	S	P
cons13205_A1	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	K	R	S	A
cons35195_AE_pol	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	K	R	S	A
cons14719_uA (crf_AE)	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	K	G	S	A
cons11168_uA (AG_A1)	I	Y	Q	E	P	F	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	K	K	R	S	A
cons01717_crf_06	I	Y	Q	E	P	H	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	M	R	S	A
cons26478_Mosaik	I	Y	Q	E	P	Y	K	N	L	K	T	G	K	Y	A	R	T	R	S	A

Seq./Positionen	361*	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
Consensus_A (%)	H (100)	T	N	D	V	K	Q	L	A	E	V (95)	V	Q	K	V	V (60) A (31)	M	E	S	I
cons30845_A Insertion	H	T	N	D	V	K	Q	L	V	E	V	V	Q	K	V	A	M	E	S	I
cons13205_A1	H	T	N	D	V	R	Q	L	A	E	V	V	Q	K	V	V	M	E	S	I
cons35195_AE_pol	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	E	V	V	Q	K	I	A	T	E	S	I
cons14719_uA (crf_AE)	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	A	M	V	Q	K	V	A	M	E	S	I
cons11168_uA (AG_A1)	H	T	N	D	V	R	Q	L	V	E	V	V	Q	K	V	V	T	E	S	I
cons01717_crf_06	H	T	N	D	V	K	Q	L	T	E	T	V	Q	K	I	S	L	E	S	I
cons26478_Mosaik	H	T	N	D	V	R	Q	L	T	D	V	V	Q	K	I	S	L	E	S	I

Seq./Positionen	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390*	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
Consensus_A (%)	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K (66) R (33)	L	P	I	Q	K (97)	E (95)	T	W	E	T
cons30845_A Insertion	V	I	W	G	K	T	P	K	I	T	T	-	H	T	K	E	T	W	E	T
cons13205_A1	V	I	W	G	K	A	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons35195_AE_pol	V	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	G	T
cons14719_uA (crf_AE)	I	I	W	G	K	T	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	A
cons11168_uA (AG_A1)	V	I	W	G	K	T	P	K	F	K	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons01717_crf_06	V	I	W	G	K	I	P	K	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T
cons26478_Mosaik	V	I	W	G	K	I	P	R	F	R	L	P	I	Q	K	E	T	W	E	T

Seq./Positionen	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
Consensus_A (%)	W	W	M	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons30845_A Insertion	W	W	M	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons13205_A1	W	W	M	D	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons35195_AE_pol	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons14719_uA (crf_AE)	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons11168_uA (AG_A1)	W	W	M	E	Y	W	Q	A	T	C	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons01717_crf_06	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P
cons26478_Mosaik	W	W	T	E	Y	W	Q	A	T	W	I	P	E	W	E	F	V	N	T	P

Seq./Positionen	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
Consensus_A (%)	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	V	G	A	E	T	F
cons30845_A Insertion	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	V	G	A	E	T	F
cons13205_A1	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	V	G	A	E	T	F
cons35195_AE_pol	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	V	G	A	E	T	F
cons14719_uA (crf_AE)	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons11168_uA (AG_A1)	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	K	D	P	I	L	G	A	E	T	F
cons01717_crf_06	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	T	E	P	I	V	G	A	E	T	F
cons26478_Mosaik	P	L	V	K	L	W	Y	Q	L	E	T	E	P	I	A	G	A	E	T	F

Seq./Positionen	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
Consensus_A (%)	Y	V	D (100)	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons30845_A Insertion	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons13205_A1	Y	V	D	G	A	A	S	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons35195_AE_pol	Y	V	D	G	A	A	S	R	E	T	K	Q	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons14719_uA (crf_AE)	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	I	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons11168_uA (AG_A1)	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	L	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons01717_crf_06	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	K	G	K	A	G	Y	V	T	D
cons26478_Mosaik	Y	V	D	G	A	A	N	R	E	T	K	Q	G	K	A	G	Y	V	T	D

Seq./Positionen	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
Consensus_A (%)	R	G	R	Q	K	V	V	S	L (99)	T (89)	E	T	T (100)	N (100)	Q (100)	K (94)	T	E (100)	L	H
cons30845_A Insertion	R	G	R	Q	K	A	V	S	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons13205_A1	R	G	R	Q	K	V	V	S	I	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons35195_AE_pol	R	G	R	Q	K	V	V	S	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons14719_uA (crf_AE)	R	G	R	Q	N	V	V	S	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons11168_uA (AG_A1)	R	G	R	Q	K	V	I	S	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	H
cons01717_crf_06	R	G	R	Q	K	I	V	S	L	E	E	T	T	N	Q	Q	T	E	L	Q
cons26478_Mosaik	R	G	R	Q	K	T	V	S	L	T	E	T	T	N	Q	K	T	E	L	Q

Seq./Positionen	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
Consensus_A (%)	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D (100)	S	Q
cons30845_A Insertion	A	V	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons13205_A1	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons35195_AE_pol	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	P	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons14719_uA (crf_AE)	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons11168_uA (AG_A1)	A	I	H	L	A	L	Q	D	S	G	S	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons01717_crf_06	A	I	N	L	A	L	Q	D	S	G	P	E	V	N	I	V	T	D	S	Q
cons26478_Mosaik	A	I	Y	L	A	L	Q	D	S	G	S	K	V	N	I	V	T	D	S	Q

Seq./Positionen	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
Consensus_A (%)	Y (99)	A	L	G	I (100)	I	Q	A	Q (99)	P	D	R	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons30845_A Insertion	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons13205_A1	Y	A	L	G	I	L	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	L	V	N	Q
cons35195_AE_pol	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	V	V	N	Q
cons14719_uA (crf_AE)	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	R	S	D	S	E	I	V	N	K
cons11168_uA (AG_A1)	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	R	S	E	S	E	I	V	N	Q
cons01717_crf_06	Y	A	L	G	I	I	Q	A	H	P	D	K	S	E	S	E	L	V	S	K
cons26478_Mosaik	Y	A	L	G	I	I	Q	A	Q	P	D	K	S	E	S	E	L	V	N	Q

Seq./Positionen	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
Consensus_A (%)	I	I	E	K	L	I	E	K	D	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H (100)	K
cons30845_A Insertion	I	I	E	K	L	I	E	K	D	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons13205_A1	I	I	E	K	L	I	G	K	D	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons35195_AE_pol	I	I	E	E	L	I	K	K	E	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons14719_uA (crf_AE)	I	I	E	K	L	I	E	K	E	R	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons11168_uA (AG_A1)	I	I	E	K	L	I	E	K	E	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons01717_crf_06	I	I	E	E	L	I	K	K	E	R	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K
cons26478_Mosaik	I	I	E	Q	L	I	Q	K	D	K	V	Y	L	S	W	V	P	A	H	K

Seq./Positionen	541	542	543	544	545	546	547	548	549*	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
Consensus_A (%)	G	I	G	G	N	E	Q	V	D (100)	K	L	V	S	S (73) N (19)	G	I	R	K (77) R (20)	V	L
cons30845_A Insertion	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	V	R	R	V	L
cons13205_A1	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons35195_AE_pol	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	S	G	I	R	K	V	L
cons14719_uA (crf_AE)	G	I	G	G	N	E	Q	I	D	K	L	V	S	N	G	I	R	R	V	L
cons11168_uA (AG_A1)	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons01717_crf_06	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	N	G	I	R	K	V	L
cons26478_Mosaik	G	I	G	G	N	E	Q	V	D	K	L	V	S	K	G	I	R	K	V	L

Tab A.2: Alle Positionen der Reversen Transkriptase von HIV-1 für Subtyp A (Polymerase, Connection und RNase H). Jeweils erste Zeile: Positionen, wie sie in der balancierten Consensus-Sequenz für Subtyp A am häufigsten vorkommen (Prozentangaben nur für relevante Positionen). Linke Spalte: Patientensequenzen.

Gelb: Finger-Mutationen (inklusive TAMs),

rosa: Mutationen unter NNRTI-Therapie,

blau: Mutation an M184V,

grün: Primer Grip-Positionen,

violett: aktives Zentrum der RNase H,

rot: relevante Positionen der Connection und RNase H Domänen, die in der aktuellen Literatur beschrieben wurden.

* Positionen 359,360, 361 und 390 gehören dem Primer Grip an, Position 549 dem aktiven Zentrum der RNase H.

A.3 Aminosäurecode

Aminosäuren	3-Letter-Code	1-Letter-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

Mein großer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Josef Eberle (Max von Pettenkofer Institut, München). Er ermöglichte das Zustandekommen dieser Arbeit, und er förderte und unterstützte die Doktorandin, wo er konnte. Hervorzuheben ist seine Bereitschaft, sich auf die besondere Herausforderung einer externen Studentin einzulassen und ein Thema zu finden, das in einem zeitlich begrenzten Raum bearbeitbar und dabei hochinteressant und herausfordernd für mich war.

Zu danken ist Hiroko Matsuba, die mich wunderbar in die Geheimnisse des Labors eingeführt hat und stets mit Geduld und stets für Fragen und bei Unklarheiten bereitstand.

Herzlicher Dank gebührt Andreas Osterman, der vor allem bei technischen und IT-Problemen immer wieder hilfreich und geduldig zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön geht an Dipl.-Ing. Stefanie Thiel, die mir die Grundlagen der Consensus- bzw. Referenzsequenz vermittelte.

Dr. med. Lars Doelken danke ich dafür, mit seinen Statistikenntnissen die Richtigkeit meiner Resultate gesichert zu haben.

Für ihre mentale und auch finanzielle Unterstützung möchte ich von Herzen meinen Eltern, Wiebke und Helmut Schönewolf, danken.

Die Unterstützung durch meinen Freund, Dr. Fritz Taucher, mit seiner Geduld, seinen Ideen und seinem kritisch hinterfragenden analytischen Geist, hätte ich nicht missen mögen!

Lebenslauf

- 18.1.1980 geboren in Hamburg
- 1986-1999 Grundschule Windmühlenweg und Gymnasium Hochrad, Hamburg
Abschluss: Abitur
- 9/1999 - 7/2000 Freiwilliges Soziales Jahr im Camphill Village, Minnesota (USA)
(Einrichtung für betreutes Wohnen und Arbeiten mit Behinderten)
- 10/2000 - 7/2002 Ausbildung zur Verlagskauffrau beim Carl Hanser Verlag, München
- 10/2002 - 12/2008 Studium der Humanmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
Abschluss: Zweites Staatsexamen
- seit 3/2009 Wissenschaftliche Mitarbeit,
Dermatologische Klinik, Unispital Zürich (Schweiz)
- seit 1/2010 Zusatzstudium zum Master of Science in Medical Biology,
Universität Zürich (Schweiz)

Zürich, Juli 2010