

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl Virologie

Vorstand Prof. Dr. med. Ulrich Koszinowski

## **Analyse eines unterquantifizierten HIV-1-Isolats**

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

vorgelegt von

Christin Mariel Jauer

aus

Berlin

Jahr

2010



**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Bogner  
Prof. Dr. Ralph Rupp

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2010

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differenciation
cDNA	Complementary DNA
CDR	Chain complementarity-determining region
CXCR	CX Chemokin-Rezeptor
DNA	Deoxyribonucleic Acid
cATP	Deoxy-Adenosin-Triphosphat
cCTP	Deoxy-Cytidin-Triphosphat
cGTP	Deoxy-Guanosin-Triphosphat
cNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphat
cTTP	Deoxy-Thymidin-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat-Essigsäure
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm oder Beschleunigung
GagPolITF	GagPol Transframe
gp	Glykoprotein
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HXB2	HIV-1 Subtyp B Referenz-Klon
H <sub>2</sub> O	Wasser
IL-2	Interleukin 2
LANL	Los Alamos National Laboratory
Li	Lithium
LTR	Long Terminal Repeat
mA	Milliamper
µg	Microgramm
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MVP	Max von Pettenkofer-Institut
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
p	Protein

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picogramm
pH	Potentia Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Proteaseinhibitor
pmol	picomol
rcf/g	Relative Centrifugal Force
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
tRNA <sup>Lys</sup>	Transfer Ribonucleic Acid plus Lysin
UV	Ultraviolett
V	Volt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologie der HIV-Infektion und der AIDS-Erkrankung</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Grundlagen und Pathophysiologie der HIV-Infektion</b>	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus</b>	<b>11</b>
1.3.1	Struktureller Aufbau von HIV	11
1.3.2	Aufbau des HIV-Genoms	12
<b>1.4</b>	<b>Der HIV-Replikationszyklus</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Verschiedene Subtypen von HIV</b>	<b>16</b>
<b>1.6</b>	<b>Virologische HIV-Diagnostik</b>	<b>17</b>
1.6.1	Nachweis einer HIV-Infektion	17
1.6.1.1	Antikörper-Nachweis	18
1.6.1.2	Virusnachweis	18
1.6.2	Tests in der HIV-Krankheitsverlaufskontrolle und Therapiemonitoring	19
1.6.2.1	Kombination von Viruslast und CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozytenzellzahl	19
1.6.2.2	Resistenztestung	20
<b>1.7</b>	<b>Therapieoptionen</b>	<b>20</b>
1.7.1	Antiretrovirale Medikamente	21
<b>1.8</b>	<b>Klinische Beobachtung</b>	<b>21</b>
<b>1.9</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Reagenzien, Materialien, Geräte und Programme</b>	<b>23</b>
2.1.1	Reagenzien und Materialien	23
2.1.1.1	Pipetten, Pipettenspitzen, Gefäße und Platten	23

2.1.1.2	Tests zur Viruslastmessung	24
2.1.1.3	Materialien für die Virusisolierung	25
2.1.1.4	Materialien für die Virusextraktion	26
2.1.1.5	Materialien für die Reverse Transkription	26
2.1.1.6	Primer	26
2.1.1.7	Materialien für die PCR	30
2.1.1.7.1	Expand Long Range PCR	30
2.1.1.7.2	Nested PCR	30
2.1.1.8	Materialien für die Agarosegelelektrophorese	30
2.1.1.9	Materialien für die Sequenzierung	31
2.1.2	Verwendete Geräte	31
2.1.3	Verwendete Cycloerprogramme	33
2.1.3.1	PCR-Cycloerprogramme	33
2.1.3.2	Cycloerprogramm für die Sequenzreaktion	33
2.1.4	Verwendete Software	34
2.1.4.1	HIV Sequence Database	34
2.1.4.2	Primer 3	34
2.1.4.3	MEGA4	34
2.1.4.4	Gap4	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
2.2.1	Viruslastmessung	35
2.2.2	Virusisolierung	35
2.2.2.1	PBMC-Separation	35
2.2.2.2	Kultivierung der PBMC	35
2.2.2.3	CD8 <sup>+</sup> T-Zelldepletion	35
2.2.2.4	Virusisolierung	36
2.2.2.5	Virusantigennachweis (HIV p24-Antigen)	36
2.2.3	Primerauswahl	37
2.2.4	RNA-Extraktion	37
2.2.5	Reverse Transkription	39
2.2.6	PCR	39
2.2.6.1	Expand Long Range PCR	39
2.2.6.2	Nested PCR mit Taq Polymerase	40
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	41
2.2.7.1	Herstellung von TBE-Puffer	41
2.2.7.2	Herstellung des Gels für die Agarosegelelektrophorese	41

2.2.7.3	Herstellung von Bromphenolblaupuffer	42
2.2.7.4	Auftragen der PCR-Amplifikate	42
2.2.7.5	Auftrennung der Amplifikate und Photographie	42
2.2.8	DNA-Sequenzierung mit der Didesoxy-Methode	42
2.2.8.1	Erste Fällung	42
2.2.8.2	Sequenzreaktion	43
2.2.8.3	Zweite Fällung	44
2.2.8.4	Sequenzierung	44
2.2.9	Übertragen der Ergebnisse in Gap4	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der PCR</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der ersten Fällung</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse der Sequenzierung</b>	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b>Bearbeitung der Sequenz mit Computerprogrammen</b>	<b>51</b>
3.4.1	Phylogenetischer Baum	51
3.4.2	RIP3-Analyse	53
3.4.2.1	Vergleich von MVP-30846 mit HIV-1-M-Konsenssequenzen	54
3.4.2.2	Vergleich von MVP-30846 mit F1-Konsensussequenzen	55
<b>3.5</b>	<b>Besondere Auffälligkeiten im Virusgenom</b>	<b>56</b>
3.5.1	Vergleich des Genoms von MVP-30846, Konsensus F1 und HXB2 auf Höhe der Deletion	57
3.5.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen von MVP-30846, Konsensus F1 und HXB2 auf Höhe der Deletion	57
<b>3.6</b>	<b>Vergleich des Virusgenoms mit Primern und Detektionssonde des COBAS® Amplicor® Viruslasttests</b>	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Vergleich des Virusgenoms mit dem Amplicon des COBAS® TaqMan® Viruslasttests</b>	<b>59</b>



<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodisches Konzept</b>	<b>60</b>
4.1.1	Strategie der PCR-Amplifikation mit nested PCR	60
4.1.2	Strategie der Amplifikation aus Patientenplasma oder Kulturüberstand	60
<b>4.2</b>	<b>Einordnung der Ergebnisse</b>	<b>61</b>
4.2.1	Resultat der Analyse des Virusgenoms	61
4.2.2	Deletion im gag-Protein p6 und in GagPol TransFrame/p6*	61
4.2.2.1	Deletion im gag-Protein p6	61
4.2.2.2	Deletion in GagPol TransFrame/p6*	62
4.2.3	Grund für das Scheitern der Viruslastmessung durch COBAS® Amplicor® und COBAS® TaqMan®	63
<b>4.3</b>	<b>Bedeutung der Viruslastmessung im klinischen Alltag</b>	<b>65</b>
4.3.1	Voraussage von Krankheitsverlauf und Infektiosität, Therapieentscheidung	65
4.3.2	Einsatz der Viruslastmessung als Screeningtest für Blutspenden	67
<b>4.4</b>	<b>Ausblick und Verweis auf andere Beobachtungen</b>	<b>67</b>
4.4.1	Generelles Problem von Viruslasttests bei der Detektion von HIV-1-Subtypen	67
4.4.2	Bedeutung der F1-Subtypen weltweit	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>77</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion und der AIDS-Erkrankung

Im Jahre 1981 wurde erstmals eine Immunschwäche beschrieben, die vorwiegend bei homosexuellen Männern auftrat. Montagnier, Barré-Sinoussi und Chermann (Chermann, Barré-Sinoussi et al., 1983; Barré-Sinoussi, Chermann et al., 1983) erkannten 1983 das HIV (Human Immunodeficiency Virus) als Auslöser der Krankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi wurden 2008 dafür mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Insgesamt haben sich etwa 58 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert, 25 Millionen sind daran schon gestorben. Jährlich sterben ca. 2 Millionen Menschen an AIDS und 2,7 Millionen infizieren sich neu mit HIV. 33 Millionen leben mit HIV, ein Teil davon unter Therapie ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). Dies erfordert zuverlässige HIV-Tests, sowohl für die Diagnostik der Krankheit als auch für die Therapiekontrolle.

Der Ausbruch der Erkrankung kann in den reichen Industrieländern durch neueste Therapien meist lange hinausgezögert werden. Die große Problematik besteht aber in ärmeren Ländern wie Südafrika und Thailand, in denen sich HIV weiter schnell ausbreitet und für die meisten Patienten keine antiretrovirale Therapie zur Verfügung steht (Hoffmann, Rockstroh et al., 2007).

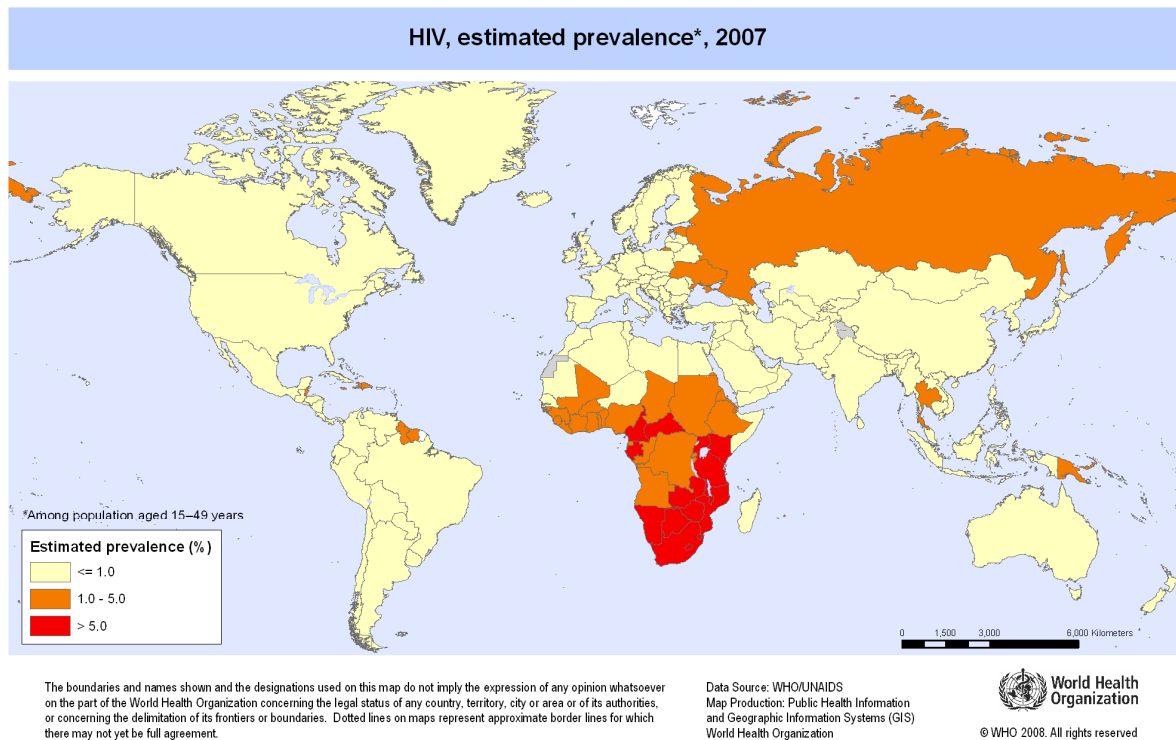


Abbildung 1: HIV-Prävalenz in Prozent, 2007

Quelle: [www.who.int](http://www.who.int)

World: Estimated Prevalence, 2007, Date: 23 Feb 2009, Source : WHO, Topic : HIV/AIDS

## 1.2 Grundlagen und Pathophysiologie der HIV-Infektion

HIV ist ein Retrovirus und gehört zur Familie der Lentiviren. Retroviren sind RNA-Viren, die charakteristischerweise über das Enzym Reverse Transkriptase verfügen. Dieses Enzym schreibt die Virus-RNA nach Eindringen des Virus in eine Zelle in DNA um, die dann in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Das Virus dringt in den menschlichen Körper über Körpersekrete wie Vaginalsekret und Sperma oder über Blut ein und befällt vor allem Makrophagen und CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten, auch Helferzellen genannt.

Nach Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom können neue Viruspartikel gebildet werden, die sich von der Zelle abschnüren („budding“) und weitere Zellen infizieren. Infizierte, ruhende CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die integrierte HIV-DNA enthalten, stellen ein langlebiges Virusreservoir dar und sind wahrscheinlich der Grund dafür, dass HIV trotz spezifischer Immunantwort und HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) heutzutage noch nicht eradiziert werden kann.

Charakteristisch für HIV ist ebenfalls die hohe Fehlerrate der Reversen Transkription. Durch diese Fehler entstehen im Laufe der Replikation neue HIV-Varianten, die

resistent gegen Therapien und gegen Abwehrmechanismen des Immunsystems sein können.

Die Freisetzung einer hohen Kopienzahl hat zur Folge, dass klinisch erfassbar die CD4<sup>+</sup>T-Zellzahl absinkt (ausgelöst vor allem durch die zytolytische Wirkung des HIV, Apoptosemechanismen und Lyse durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten) und opportunistische Infektionen und Malignome im immungeschwächten Körper auftreten (Modrow, Falke et al., 2002; Hoffmann, Rockstroh et al., 2007)

### **1.3 Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus**

#### 1.3.1 Struktureller Aufbau von HIV

Ein HI-Viruspartikel ist ca. 100 nm groß. Es besteht aus einer Lipidmembran und einem Viruskapsid.

Die Lipidmembran besteht prinzipiell aus 2 Anteilen: Einerseits aus der Zytoplasmamembran der virusproduzierenden Zelle mit verschiedenen Proteinen, zum Beispiel HLA-Klasse I- und II-Molekülen, andererseits aus viralen Glykoproteinkomplexen wie gp41 und gp120. Das p17-Matrixprotein bildet im Inneren der Lipidmembran eine ikosaedrische Struktur. Das konische Viruskapsid oder Core besteht aus p24-Antigen und enthält 2 Kopien der plus-Einzelstrang-RNA sowie Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease), die essenziell für die Replikation sind (Hoffmann, Rockstroh et al., 2007; Modrow, Falke et al., 2002).

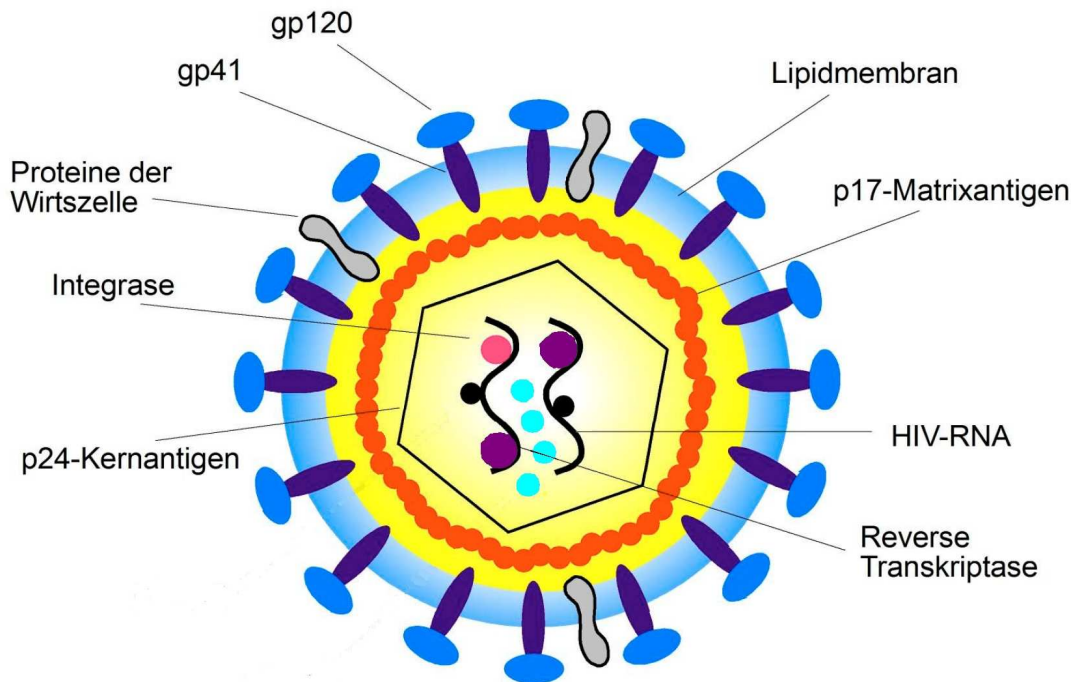


Abbildung 2: Das HI-Virus (modifiziert (Hoffmann, Rockstroh et al., 2007))

### 1.3.2 Aufbau des HIV-Genoms

Das Aufbauschema der HIV-cDNA ist klassischerweise 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3'. Die HIV-RNA liegt in Form einer eukaryonten mRNA vor, das heißt einer Einzelstrang-RNA mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Polyadenylierung. Der LTR-Bereich (Long Terminal Repeat) enthält Promotoren, cis-aktive Elemente und Sequenzen für die Integration, das Spleißen, das Anlagern an die Nukleokapsidproteine und die Initiation der Reversen Transkription. Außerdem ist LTR der Bereich, der bei der Integration des Provirus beidseits mit dem Wirtsgenom verbunden wird. Die sogenannte Primer-Bindungsstelle im LTR ist mit einem tRNA<sup>Lys</sup>-Molekül komplexiert.

Das Genom enthält die drei großen Gene gag, pol und env, die für das Kapsid (zum Beispiel p17, p24 und p7), die Enzyme (zum Beispiel Protease, Reverse Transkriptase und Integrase) und die Glykoproteine (zum Beispiel gp120 und gp41) kodieren sowie für mehrere kleine Gene (vif, vpr, tat, rev, vpu, nef), die Regulations- und Stimulationsfunktionen haben. Dabei ist auffällig, dass fast alle Gene, zum Beispiel gag und pol, sich überschneiden. Sie werden in verschiedenen Leserastern abgelesen: Das gag/pol-Vorläuferprotein kann zum Beispiel nur entstehen, wenn Ribosomen in einer uridinreichen Region irrtümlich zurückgleiten und sich das

Leseraster um  $-1$  verschiebt (Jacks, Power et al., 1988). Durch diesen Mechanismus kann mehr genetische Information auf weniger Basenpaaren kodiert werden (Hoffmann, Rockstroh et al., 2007; Modrow, Falke et al., 2002).

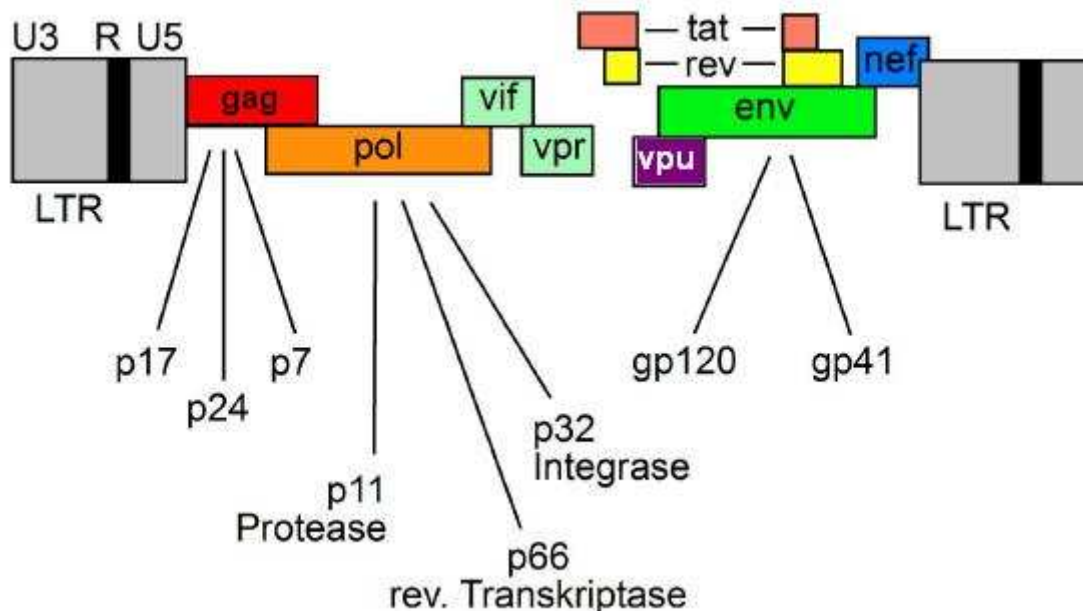


Abbildung 3: Der HIV-Genomaufbau (modifiziert (Hoffmann, Rockstroh et al., 2007))

#### 1.4 Der HIV-Replikationszyklus

Als primärer Angriffspunkt auf der Zelle dient dem HI-Virus das Membranprotein CD4 (Sattentau & Weiss, 1988). Dieses Protein befindet sich auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten und dient normalerweise zur Bindung an HLA Klasse II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen.

Über die C3-Region des gp120 bindet das Virus an die Domänen CDR2 und CDR3 des CD4-Komplexes. Als Kofaktoren wirken hierbei CCR5 (Alkhatib, Combadière et al., 1996) auf Monozyten und Makrophagen und CXCR4 auf T-Helferzellen. Über eine Konformationsänderung von gp120 wird die Membranfusion von gp41, einem nicht kovalent mit gp120 verbundenen transmembranen Protein, aktiviert. Durch Einlagerung in die Zytoplasmamembran verschmilzt diese mit der Virushülle. Das Kapsid kann in die Zelle eindringen.

Im Zytoplasma wird nun die Virus-RNA durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben und in Form eines Präintegrationskomplexes mithilfe von p17 in den Zellkern transportiert. Im Zellkern wird durch das Virusenzym

Integrase die doppelsträngige Virus-DNA an einem weitgehend zufälligen Ort in das Wirtsgenom integriert.

Durch die Transkription, die vor allem durch das Tat-Protein bis auf das Hundertfache gesteigert wird, entsteht nun neue Virus-mRNA. Diese kann in ungespleißter, einfach oder mehrfach gespleißter Form vorliegen.

- Ungespleißte mRNA kodiert für das gag-Protein und das gag/pol-Vorläuferprotein.
- Einfach gespleißte mRNA kodiert für die Proteine env, vif, vpr und vpr.
- Mehrfach gespleißte mRNA kodiert für die Proteine tat, rev und nef.

Nach der Translation, die teilweise innerhalb und außerhalb des Endoplasmatischen Retikulums stattfindet, akkumulieren Proteine und RNA-Genom an der inneren Zelloberfläche. Die Zellmembran stülpt sich aus und bildet Vesikel, die sich abschnüren. In diesem unreifen Viruspartikel entsteht aus dem gag/pol-Vorläuferprotein durch einen autokatalytischen Prozess die Protease, die dann aus diesem Protein die Reverse Transkriptase und die Integrase prozessiert. Aus dem gag-Protein entstehen Matrixprotein p17, Kapsidprotein p24, Nukleokapsidprotein p7 und Linkprotein p6.

Durch zelluläre Proteasen werden aus dem env-Vorläuferprotein gp120 und gp41 prozessiert, die für Adsorption und Fusion von HIV mit der Zelle zuständig sind.

Durch diverse Umlagerungsprozesse und die Ausbildung des Kapsids wird das Viruspartikel erst außerhalb der Zelle infektiös.

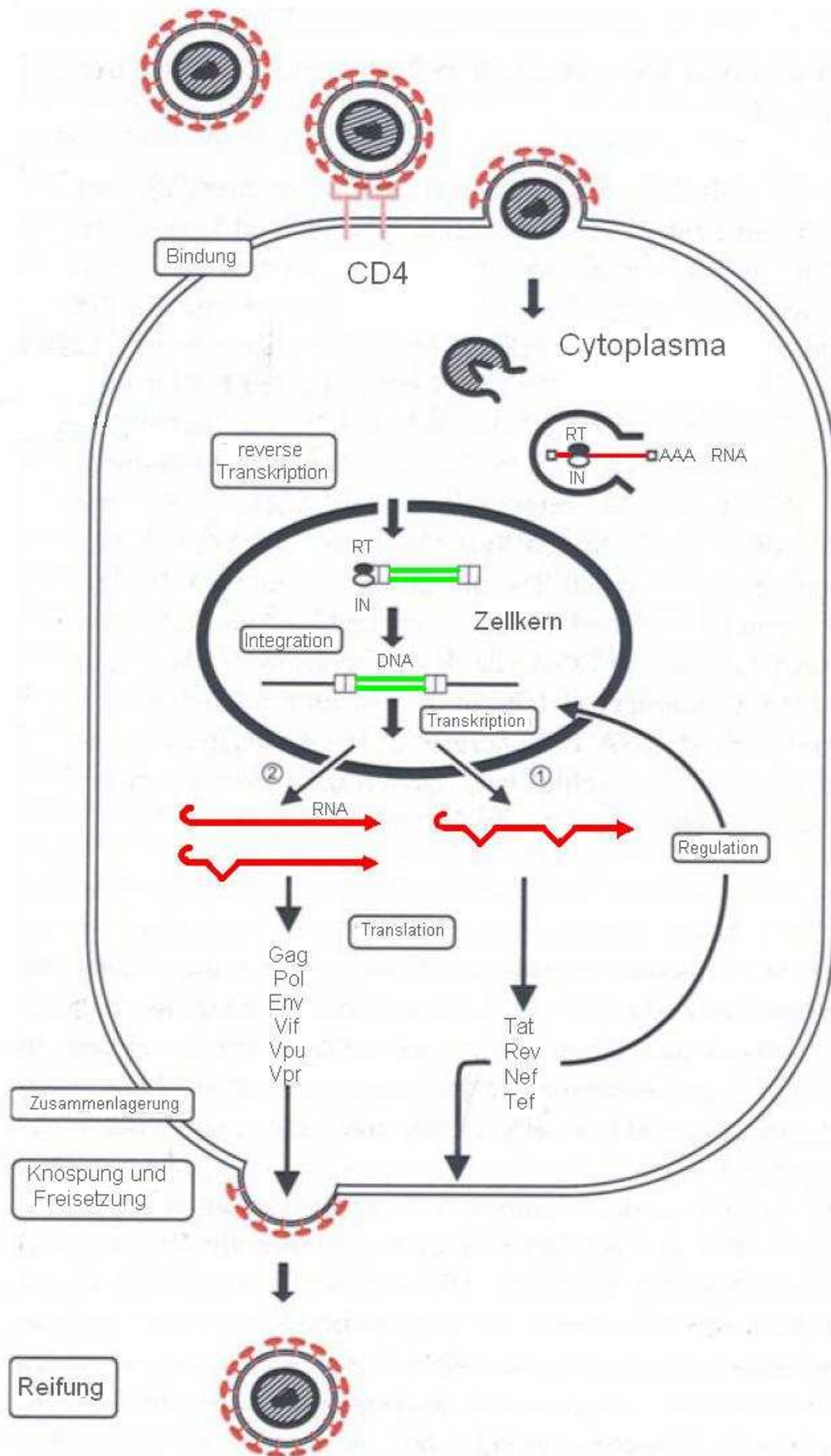


Abbildung 4: HIV-Replikationszyklus (modifiziert (Modrow, Falke et al., 2002))



## 1.5 Verschiedene Subtypen von HIV

HIV ist eng mit SIVs (Simian Immunodeficiency Virus) verwandt. SIV-1 kommen in Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) und Gorillas vor. SIV-2 sind bei westafrikanischen Mangaben (*Cercocebus atys*) verbreitet. Diese Tiere werden dort als Haustiere gehalten, gejagt und gegessen. SIVs wurden mehrfach auf den Menschen übertragen und entwickelten sich daraufhin zum humanpathogenen HIV-1 (Gürtler, 2004), bzw. HIV-2, je nach Herkunft der Viren.

Die bisher ermittelten Sequenzen unterscheiden sich zum Teil stark. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Viren klassifiziert.

Heutzutage teilt man HIV-1 in drei Klassen ein: HIV-1-M (Major), HIV-1-O (Outlier) und HIV-1-N (New). HIV-1-M ist am weitesten verbreitet und macht mehr als 99% aller weltweiten Infektionen aus. Diese Klasse wird in die Subtypen A bis K eingeteilt, wovon wiederum der Subtyp C am häufigsten vertreten ist (Butler, Pandrea et al., 2007). Die Viren der Klasse HIV-1-M scheinen genotypisch alle von einem einzigen Virus abzustammen, das ursprünglich in Schimpansen beheimatet war.

Von HIV-2 kennt man die Subtypen A bis H, die sich genomisch allerdings sehr stark unterscheiden und jeweils mehr einem SIV ähneln als dass sie untereinander verwandt wären. Man nimmt also für diese Untergruppen jeweils ein eigenes Übertragungsereignis an. Die Theorie der einzelnen Tier-zu-Mensch-Übertragungsereignisse wird durch die Tatsache unterstützt, dass Zentral- und Westafrika (Heimat der Affen mit SIV) die Regionen mit der größten genetischen Vielfalt von HIV sind, wobei die meisten unterschiedlichen HIV-1-Subtypen (HIV1-M, -N und -O) in der Republik Kongo und in Kamerun gefunden wurden. Die größte Vielfalt an HIV-2-Subtypen findet sich in der Elfenbeinküste und in Sierra Leone (Modrow, Falke et al., 2002).

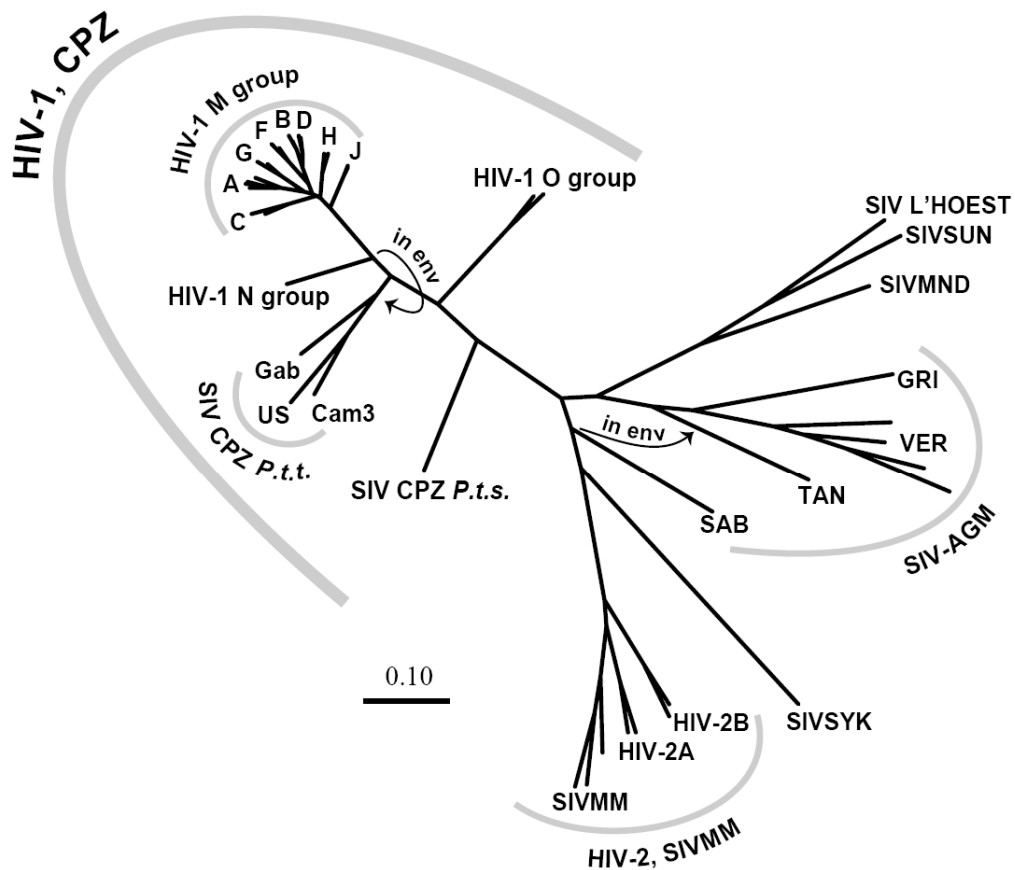


Abbildung 5: Phylogenetische Verwandtschaft von Lentiviren (HIV, SIV) im pol-Bereich (Kuiken, Foley et al., 1999)

## 1.6 Virologische HIV-Diagnostik

In der HIV-Diagnostik stehen sowohl Tests zur Primärdiagnostik der Infektion (HIV-Antikörper-Diagnostik und p24-Antigennachweis, HIV-Schnelltest, HIV-PCR) als auch Tests zur Bestimmung des Krankheitsfortschritts und zur Therapiekontrolle (Viruslastmessung, Resistenztestung, Bestimmung der CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl) zur Verfügung.

### 1.6.1 Nachweis einer HIV-Infektion

Die Diagnose der HIV-Infektion erfordert mindestens zwei unterschiedliche Tests: einen Suchtest, der vorhandene HIV-Antikörper und p24-Antigen nachweist, und

einen Bestätigungstest. Außerdem wird in bestimmten Fällen auch eine HIV-PCR zum Virusdirektnachweis durchgeführt.

#### 1.6.1.1 Antikörper-Nachweis

Frühestens 4 bis 6 Wochen nach der HIV-Infektion regt eine starke Virämie die Produktion von HIV-Antikörpern an. Dies ist der Zeitpunkt der Serokonversion. Nach ca. 12 Wochen sind nahezu 100 % der Patienten im Antikörper-Suchtest, der auf dem Prinzip des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) basiert, HIV-positiv.

Die Fähigkeit zur Antikörperproduktion bleibt fast immer lebenslang erhalten, da ein permanenter Antigenreiz vorhanden ist.

Der Zeitraum zwischen Infektion und Serokonversion, die diagnostische Lücke, stellt ein Problem in der HIV-Diagnostik dar, da Patienten, die noch nicht serokonvertiert sind, mit dem Antikörper-Nachweis HIV-negativ sind.

Der Antikörper-Suchtest stellt ein preiswertes und schnelles Screening-System dar. Zur Vermeidung von falsch-positiven Testergebnissen sollte aber immer ein Bestätigungstest durchgeführt werden, der in Deutschland üblicherweise ein Western Blot oder Line Immuno Assay (McDougal, Cort et al., 1985) sein kann.

Außerdem gibt es neuerdings HIV-Schnelltests, die innerhalb von 15 Minuten ein Ergebnis anzeigen. Diese sind aber weder besonders sensitiv, noch besonders spezifisch und sollten daher in der Routinediagnostik nicht angewandt werden.

#### 1.6.1.2 Virusnachweis

Der Direktnachweis von p24-Antigen (Gürtler, Mühlbacher et al., 1998) mittels ELISA versucht die diagnostische Lücke zu verkleinern, indem Virusbestandteile nachgewiesen werden. Dazu müssen aber eine hohe Virämie (ca. 100000 Viruskopien/ml) und eine geringe Menge an Anti-p24-Antikörpern vorliegen.

In seltenen Fällen ist in der Primärdiagnostik ein HIV-Nukleinsäurenachweis in Form einer PCR nötig. Der Verdacht auf eine frische Infektion oder die Testung Neugeborener HIV-infizierter Mütter können ein Grund für solch eine Testung sein. Ebenfalls wird die HIV-PCR zur Testung von Blutkonserven verwendet. Die diagnostische Lücke soll bei Blutspenden durch HIV-1-Nukleinsäurenachweis auf ein Minimum verkleinert werden: Solange der ELISA-Test aufgrund noch nicht gebildeter Antikörper bei einer frischen Infektion negativ bleibt, kann eine HIV-PCR Viren

nachweisen. Bei einem Scheitern dieser Viruslastmessung droht dem Empfänger der Blutspende eine HIV-Infektion.

### 1.6.2 Tests in der HIV-Krankheitsverlaufskontrolle und Therapiemonitoring

In der HIV-Krankheitsverlaufskontrolle und zum Therapiemonitoring kommen verschiedene Methoden zum Einsatz: Die quantitative HIV-PCR zur Messung der Viruslast, die Bestimmung der CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl sowie Resistenztestungen, die die Empfindlichkeit von Virusstämmen gegen antiretrovirale Medikamente überprüfen.

#### 1.6.2.1 Kombination von Viruslastmessung und CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl

Die HIV-PCR kann auch als quantitative PCR (Stieger, Démollière et al., 1991) zur Viruslastbestimmung verwendet werden. Die hierbei ermittelte Viruslast (die untere Nachweisgrenze liegt bei 20-40 Kopien/ml) ist zur Therapiekontrolle und zur Abschätzung des Krankheitsverlaufs essenziell (Berger, Braner et al., 1998). Unter antiretroviraler Therapie sollte die Viruslast immer unter der Nachweisgrenze liegen. Am aussagekräftigsten für HIV-Krankheitsverlaufskontrolle und Therapiemonitoring sind eine Kombination der Werte von Viruslast und CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl. Die CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl vermittelt einen Eindruck vom Schaden, der durch HIV bereits entstanden ist. Werte unter 200 Zellen/ $\mu$ l deuten auf eine ernsthafte Immunschwäche hin.

Für diese Arbeit sind vier im Handel erhältliche Viruslast-Tests von besonderer Bedeutung:

Die vom Marktführer, Roche Diagnostics, hergestellten COBAS® TaqMan® und COBAS® Amplicor®, deren Primer im gag-Bereich des Virusgenoms liegen, sowie der von Abbott Diagnostics hergestellte m2000rt®, dessen Primer im pol-Bereich des Virusgenoms liegen. COBAS® TaqMan® und m2000rt® sind vollautomatisierte Real Time-PCR's, die eine genauere Bestimmung der zu Beginn der Messung hinzugefügten RNA-Menge erlauben als der etwas ältere COBAS® Amplicor®, der auf der Basis einer Reverse Transkriptase-PCR arbeitet.

### 1.6.2.2 Resistenztestung

Im Falle des Verdachts auf eine Resistenz des HIV gegen bestimmte Medikamente (zum Beispiel bei einem Anstieg der Viruslast über die Nachweisgrenze während einer antiretroviralen Therapie) wird eine Resistenztestung durchgeführt.

Es gibt genotypische und phänotypische (Garcia-Lerma & Heneine, 2002) Testverfahren:

Bei der genotypischen Testung werden bestimmte Abschnitte des betroffenen Virus sequenziert, da Resistenzen auf Mutationen des Virus an den Angriffspunkten der Medikamente basieren. Daher kann mit einem Abgleich der Sequenzen mit einer Datenbank resistenzassoziierter Mutationen auf eine Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegen Medikamentengruppen geschlossen werden.

Bei der phänotypischen Testung wird die Situation im menschlichen Körper simuliert und eine Lymphozyten-Zellkultur mit dem Patientenvirus oder einem rekombinanten Hybridvirus infiziert, bei dem die relevanten Genomabschnitte des Patientenvirus in ein definiertes Trägervirus eingebaut wurden. Nach erfolgreicher Infektion werden verschiedene Medikamente der Kultur hinzugefügt. Durch eine Messung der Virusvermehrung in der Kultur kann die Resistenz des Virus gegen das jeweilige Medikament abgeschätzt werden.

Da die genotypische Testung wesentlich weniger zeitintensiv und dadurch auch finanziell günstiger ist, wird sie von den meisten Labors bevorzugt (Gallant, 2005).

## 1.7 Therapieoptionen

Grundstein der HIV-Therapie sind antiretrovirale Medikamente. Diese entlasten das Immunsystem durch Reduktion der Viruslast und können einen Abfall der CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahl verhindern oder die Zellzahl auch wieder ansteigen lassen (Katzenstein, Hammer et al., 1996). Diese Medikamente können teilweise starke Nebenwirkungen (zum Beispiel Polyneuropathien, Lipodystrophie oder Durchfälle) auslösen, weshalb eine gute Patientenführung ein wichtiger Bestandteil des Betreuungskonzepts ist. Außerdem müssen opportunistische Infektionen bekämpft werden.

### 1.7.1 Antiretrovirale Medikamente

Antiretrovirale Medikamente sollen die Vermehrung des Virus oder das Eindringen in die Wirtszelle verhindern und dabei eine möglichst geringe Zellschädigung vermitteln. Es ist also naheliegend, spezifische Enzyme und Prozesse des Virus zu inhibieren. Im Falle von HIV kommen Bindungs- und Fusionsprozesse mit der Zelle sowie die Reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease zur Inhibition in Frage (De Clercq, 2007).

Derzeit sind NRTI (Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren) und NNRTI (Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren), PI (Proteaseinhibitoren) und ein Fusionsinhibitor im klinischen Einsatz. Kürzlich wurden ein Attachmentinhibitor, ein CCR5-Antagonist und ein Integraseinhibitor (Fadel & Temesgen, 2007; Grinsztejn, Nguyen et al., 2007) zugelassen. Diese neuen Klassen sind vor allem für Patienten, die mit einem multiresistenten Virus infiziert sind, von großer Bedeutung.

### 1.8 Klinische Beobachtung

Im Rahmen der klinischen Arbeit des Salzburger Universitätsklinikums (SALK, Innere Medizin III), Österreich, wurde ein Patient (Patient A) auffällig, der aus der Demokratischen Republik Kongo stammt. Der Patient hatte eine typische Tuberkulose, eine CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl von ca. 560/μl und eine mehrmals (siehe Tabelle, 15.02.2006, 23.02.2006, 29.08.2006) mit dem COBAS® TaqMan® bestimmte Viruslast von <40 Kopien/ml. Die behandelnde Ärztin, Frau Dr. Ninon Taylor, hatte aufgrund der Erwartungswahrscheinlichkeit für sogenannte Elite-Controllers, das sind Patienten, die langjährig ohne Therapie die HIV-Replikation unter der Nachweisgrenze halten können, Zweifel an der Korrektheit der Viruslastmessung und ließ eine Probe (13.09.2006) des Patienten durch das Max von Pettenkofer-Institut überprüfen. Der hierbei angewandte m2000rt® ergab eine Viruslast von 21000 Kopien/ml. Dieses Ergebnis ist mindestens 500fach höher als das mit dem COBAS® TaqMan® ermittelte Ergebnis.

Daraufhin wurden ältere, konservierte Proben retrospektiv mit dem m2000rt® überprüft (Proben vom 15.02.2006, 23.02.2006 und 29.08.2006). Diese Proben waren ebenfalls unterquantifiziert worden und enthielten Viruslasten um 4000

Kopien/ml. Ein Bestätigungstest am 25.09.2006 zeigte eine Viruslast von 2200 Kopien/ml.

Eine Testung des Materials mit dem COBAS® Amplicor®-Viruslasttest zeigte ebenfalls eine Viruslast unter der Nachweisgrenze an.

Diese Beobachtungen erforderten eine Meldung beim Paul-Ehrlich-Institut des Bundesministeriums für Gesundheit.

Aus dem für die weitere Analyse zur Verfügung gestellten Patientenmaterial von Patient A wurde HIV isoliert. Dieses Material wird im Folgenden Isolat MVP-30846 (HIV Sequence Database Accession Nr. EU 446022) genannt.

	Patient A	
	COBAS® TaqMan®	m2000rt®
15.02.2006	<40 Kopien/ml	3.700 Kopien/ml
23.02.2006	<40 Kopien/ml	4.000 Kopien/ml
29.08.2006	<40 Kopien/ml	4.000 Kopien/ml
13.09.2006	n. dgf.	21.000 Kopien/ml
25.09.2006	n. dgf.	2.200 Kopien/ml

Tabelle 1 : Viruslasten von Patient A, bestimmt mit COBAS® TaqMan® und m2000rt®, im Vergleich

### 1.9 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, den Grund für die Unterquantifizierung durch COBAS® TaqMan® und COBAS® Amplicor® im Virusisolat MVP-30846 zu finden, um eine Verbesserung dieser Viruslasttests zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Reagenzien, Materialien, Geräte und Programme

#### 2.1.1 Reagenzien und Materialien

##### 2.1.1.1 Pipetten, Pipettenspitzen, Gefäße und Platten

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, Germany	SafeSeal-Tips ®10 µl	692150
	SafeSeal-Tips ® 20 µl	692151
	SafeSeal-Tips ® 100 µl	692066
	SafeSeal-Tips ® 200 µl	692069
	SafeSeal-Tips ® 1 ml	692079
Eppendorf AG, Wesseling- Berzdorf, Germany	Safe Lock Tubes 0,5 ml, autoklaviert	0030 121.023
	Safe Lock Tubes 1,5 ml, autoklaviert	0030 120.086
	Pipette für Pipettenspitzen 20 µl 0.5-10 µl	3111 000.122
	Pipette für Pipettenspitzen 200 µl 2.0-20 µl	3111 000.130
	Pipette für Pipettenspitzen 200 µl 10-100 µl	3111 000.149
	Pipette für Pipettenspitzen 200 µl 20-200 µl	3111 000.157
	Pipette für Pipettenspitzen 1.000 µl 100-1,000 µl	3111 000.165



	8-Kanal-Pipette, komplett, 10-100 µl	3114 000.131
	8-Kanal-Pipette, komplett, 30-300 µl	3114 000.158
Fisher Scientific - Fisherbrand®, Schwerte, Germany	Erlenmeyerkolben 300 ml	
Molecular BioProducts, Inc., San Diego CA, USA	PCR-Gefäße, 0,2 ml PCR Tubes (Flat Cap, Pyrogenfrei, RNA-/DNA- frei, RNase-/DNase-frei)	3412
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany	Pipettenspitzen, 200 µl, gelb	70.760.002
Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA	Microtiter Plates	001-010-2401

Tabelle 2: Pipetten, Pipettenspitzen, Gefäße und Platten

#### 2.1.1.2 Tests zur Viruslastmessung

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	COBAS® TaqMan®	03501752190
	COBAS® Amplicor®	21117750123
Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany	m2000rt®	9K1501

Tabelle 3 : Tests zur Viruslastmessung

### 2.1.1.3 Materialien für die Virusisolierung

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Nalgene®Nunc™, Neerijse, Belgium	T25 Zellkulturflaschen	163371
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany	Gibco® RPMI 1640 mit Glutamin	21875-034
	Penicillin/Streptomycin 100x	15140-114
	Fetales Kälberserum	10270-106
Biotest AG, Dreieich, Germany	Interleukin 2 (IL-2) Lymphocult, Endkonzentration 2U/ml	811010
ICN LabSolutions, Northeim, Germany	Phytohämagglutinin Gebrauchslösung=100x=2µg/ml	151884
Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway	CD8 Positive Isolation Kit	113.33
	Separations-Magnet Dynal MPC E-1	N-0212
Dade-Behring/Siemens Medical Solutions Diagnostics, Eschborn, Germany	Enzygnost HIV Integral II Test	OPAA 05
GE Healthcare, München, Germany	Ficoll-Paque® PLUS	17-1440-02
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Triton x-100	3051.3

Tabelle 4 : Materialien für die Virusisolierung

#### 2.1.1.4 Materialien für die Virusextraktion

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	High Pure Viral Nucleic Acid Kit	11858874001

Tabelle 5 : Materialien für die Virusextraktion

#### 2.1.1.5 Materialien für die Reverse Transkription

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	dCTP, Li-Salt, 25µmol (250µl) entspricht 100mM	1051458
	dTTP, Li-Salt, 25µmol (250µl) entspricht 100mM	1051482
	dGTP, Li-Salt, 25µmol (250µl) entspricht 100mM	1051466
	dATP, Li-Salt, 25µmol (250µl) entspricht 100mM	1051440
Invitrogen, Karlsruhe, Germany	Superscript™ II Rnase H-Reverse Transkriptase Kit	18064-014

Tabelle 6 : Materialien für die Reverse Transkription

#### 2.1.1.6 Primer

Ella Biotech GmbH, Martinsried, Germany

Es wurde mit einer Konzentration der Primer von 10pmol/µl gearbeitet.

Name	HXB2	Sequenz des Primers
LTR	629-650	5'-CTA GCA GTG GCG CCC GAA CAG G-3'
LPBS	622-653	5'-AAA ATC TCT AGC AGT GGC GCC CGA ACA GGG AC-3'
H1GAG1	1505-1522	5'-CTA CTA GTA CCC TTC AGG-3'
H1GAG2	1685-1665	5'-CGG TCT ACA TAG TCT CTA AAG-3'
H1GAG3	1549-1569	5'-CCA CCT ATC CCA GTA GGA GAA-3'
H1GAG4	1660-1631	5'-CCT TTG GTC CTT GTC TTA TGT CCA GAA TGC-3'

H1Pol1	2811-2835	5'-TGG GAA GTT CAA TTA GGA ATA CCA C-3'
H1Pol2	3118-3093	5'-CCT ACA TAC AAA TCA TCC ATG TAT TG-3'
H1Pol3	2875-2893	5'-TGG ATG TGG GTG ATG CAT A-3'
H1Pol4	2994-2975	5'-GCA CAT TGT ACT GAT ATC TA-3'
Geno 1N	2023-2045	5'-GGC TGT TGG AAA TGT GGR AAR GA-3'
Geno 2N	3645-3624	5'-TTA CAT CAT TAG TGT GGG CAG C-3'
5ProN	2148-2165	5'-AGA GCC AAC AGC CCC RCC-3'
3ProN	2578-2559	5'-ACT GGT ACA GTY TCA ATR GG-3'
li1N	2555-2578	5'-TAG TCC TAT TGA RAC TGT RCC AGT-3'
li2N	2997-2975	5'-GAA GCA CAT TGT ACT GAT AYC TR-3'
Mi3	2809-2833	5'-TCT GGG ARG TIC ART TAG GIA TAC C-3'
Mi4	3328-3303	5'-AAY TTC TGT ATR TCA TTG ACA GTC CA-3'
Pol2	3256-3279	5'-CTG AYA AAT GGA CAG TNC AGC CTA-3'
Pol1	3300-3322	5'-AGC TGG ACT GTC AAT GAY ATA CA-3'
Gag3,5i	1427-1405	5'-TCC CAT TCT GCW GCY TCC TCA TT-3'
Gag11i	2095-2075	5'-TCC CTA AAA AAT TAG CCT GYC-3'
GAGend	2270-2251	5'-CCA AAG AGT GAT YTG AGG GA-3'
Polstart	2344-2328	5'-GTA TCA TCT GCT CCT GT-3'
Lpol	4776-4805	5'-CAC AAT TTT AAA AGA AAA GGG GGG ATT GGG-3'
LPOLi	4805-4776	5'-CCC AAT CCC CCC TTT TCT TTT AAA ATT GTG-3'
VPR	5774-5795	5'-TCA GAA TTG GGT GCC ANC ATA G-3'
VPRmus	5747-5770	5'-ATT GCA ACA ACT ACT GTT TAT CCA-3'
5tat14	5955-5978	5'-GCT TAG GCA TCT CCT ATG GCA GGA-3'
3env 155	7955-7932	5'-CTG GAG CTG CTT GAT GCC CCA GAC-3'
5env 72	6952-6975	5'-GCA CAG TAC AAT GTA CAC ATG GAA-3'
3ed33	7381-7360	5'-TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3'
E90	6953-6976	5'-CAC AGT ACA ATG TAC ACA TGG AAT-3'
ES7	7002-7021	5'-CTG TTA AAT GGC AGT CTA AGC-3'
E125	7338-7315	5'-TAA TTT CTA GGT CCC CTC AGG-3'
V3	7315-7332	5'-CCT CAG GAG GGG ACC TAG-3'
FU3	7797-7817	5'-GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC-3'
FU1	7737-7759	5'-GTG GTG CAG AGA GAA AAA AGA GC-3'
Fui	7880-7859	5'-TTG CTG TTG CAC TAT NCC AGA C-3'

Fui2	7911-7888	5'-GTT GCG CTT CAA TAG CCC TCA GCA-3'
La2	8365-8343	5'-GGT GAG TAT CCC TGC CTA ACT CT-3'
La4	8308-8287	5'-AAA CCT AYY AAG CCT CCT ACT A-3'
H1env1	7777-7793	5'-TGT TCC TTG GGT TCT TG-3'
H1env2	8030-8011	5'-GAG TTT TCC AGA GCA ACC CC-3'
H1env3	7797-7819	5'-GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC GC-3'
H1env4	7940-7917	5'-GCC CCA GAC TGT GAG TTG CAA CAG-3'
LSIGI	515-543 9600-9628	5'-TCA AGG CAA GCT TTA TTG AGG CTT AAG CA-3'

Tabelle 7 : Primer, die an hoch konservierten Stellen im HIV-Genom binden und somit für fast alle HIV-1-M/Isolate verwendbar sind

HXB2: Bindungsort des Primers laut Nummerierung des Referenzstammes HXB2

Name	HXB2	Sequenz des Primers
gag1J	2520-2540	5'-TTG ACT CAG ATT GGT TGC ACT-3'
gag2J	2768-2742	5'-TTT TCT CCA TTT AGT ACT GTC TTT TT-3'
gag3J	2451-2470	5'-TGT GGA CAC GAG GCT ATA GG-3'
gag4J	2949-2930	5'-TGG GTA TGG TGA ATG CAG TG-3'
pol1J	3233-3252	5'-TTG GAT GGG GTA TGA ACT CC-3'
pol2J	3928-3906	5'-TCA GTA ACA TAT CCT GCT TTT CC-3'
pol3J	3134-3153	5'-AGG GCA GCA TAG GAC AAA AA-3'
pol4J	4073-4053	5'-TGC TTG AAT GAT TCC TAA TGC-3'
pol5J	3742-3761	5'-GGG AAA CAT GGT GGA CAG AG-3'
pol6J	4417-4398	5'-AAT TGC CAT ATC CCT GGA CT-3'
pol7J	3626-3647	5'-TGC CCA CAC TAA TGA TGT AAA A-3'
pol8J	4474-4454	5'-CCA CTA GCT ACA TGG ACT GCT-3'
pol9J	4356-4375	5'-TGT CAG CTA AAA GGG GAA GC -3'
pol10J	5183-5164	5'-TGC CTG CTT TCA AAG TGA TG-3'
pol11J	4284-4303	5'-TGG AGA GCA ATG GCT AGT GA-3'
pol12J	5285-5266	5'-CCC AGA TGC CAC TCT CTT TC-3'
pol13J	4056-4075	5'-TTG GGA ATT CAG GCA CA-3'
pol14J	4754-4735	5'-TGC CGT CTT CAG ATG TTC AG-3'
pol15J	4134-4154	5'-GAA AGG GTC TAC CTG TCA TGG-3'
pol16J	4802-4583	5'-TGC CAC TGG TAA AAT TGC TG-3'

polvif1	4730-4753	5'-TCA AGC TGA ACA TCT TAA GAC AGC-3'
polvif2	5675-5656	5'-GAG CCA TGG CCT AGG AAA AT-3'
polvif3	4961-4980	5'-AGG TGA AGG GGC AGT AGT CA-3'
polvif4	5656-5637	5'-TGC CTA ACA GCT TCC TGC TT-3'
vif 1J	5392-5412	5'-TCT GCC ATA AGG AAA GCC ATA-3'
vif 2J	6228-6209	5'-TCA TTG CCA CTG TCT TCT GC-3'
vif 3J	5470-5493	5-TCC CTA CAA TAT TTG GCA CTA ACA-3'
vif 4J	5969-5950	5'-AGG AGA TGC CTA AGC CCT TC-3'
vifenv1	5776-5795	5'-AGA ATT GGG TGC CAC CAT AG-3'
vifenv2	6717-6693	5'-TTC TGT GGT CAT ATT GAA AGA ACA-3'
vifenv3	5863-5882	5'-GAA CCA TCC AGG AAG TCA GC-3'
vifenv4	6641-6663	5'-TGT TGT CGT TTT GGG TAC GA-3'
v3Fu1	7119-7140	5'-CCC AAC AAC AAT GTA GTG GAA A-3'
v3Fu2	8119-8100	5'-TCC CAC TCC ATC CAA GTC AT-3'
v3Fu3	7294-7319	5'-AAA CAA TAA CAT TTA ACT CAG CCT CA-3'
v3Fu4	7879-7860	5'-TGC TGT TGC ACT ATC CCA GA-3'
env1J	7007-7026	5'-AAA TGG CAG CCT AGC AGA AG-3'
env2J	7977-7958	5'-TTT CCA CAG CCA GGA GTC TT-3'
env3J	8243-8263	5'-TGA CAT ATC GAA CTG GCT GTG-3'
env4J	9212-9193	5'-TCC CAA GGT CAG TGG AAA TC-3'
env5J	8545-8565	5'-TCA TAT TAA TTG CAG CGA GGA-3'
env6J	9135-9114	5'-CCA CAG ATC AAG GAT CTC TTT T-3'
env7J	7119-7140	5'-CCC AAC AAC AAT GTA GTG GAA A-3'
env8J	7511-7492	5'-TCC CTG CCA CAT GTT GAT AA-3'
env 9J	7993-8012	5'-AAC AGC TCC TAG GGA TTT GG-3'
env10J	8683-8664	5'-ACT GCT GTG TCA AGC AA-3'
env11J	8085-8104	5'-GAA ATT TGG GGC AAC ATG AC-3'
env12J	8570-8551	5'-CAC TGT CCT CGC TGC AAT TA-3'
env13J	6353-6372	5'-TGT GTG GAA AGA AGC AAC CA-3'
env14J	6717-6697	5'-TGC TTG TCC TGG TCC TAA ATG-3'

Tabelle 8 : Primer, die speziell für Isolat MVP-30846 entwickelt wurden  
 HXB2: Bindungsort des Primers laut Nummerierung des Referenzstammes HXB2

2.1.1.7 Materialien für die PCR  
 2.1.1.7.1 Expand Long Range PCR

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Roche Diagnostics, Mannheim, Germany	Expand Long Template PCR System Kit	11 681 834 001

Tabelle 9 : Materialien für die Expand Long Range PCR

2.1.1.7.2 Nested PCR

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Applied Biosystems, Norwalk, USA	AmpliTaq® DNA Polymerase Kit	N808-0160

Tabelle 10 : Materialien für die nested PCR

2.1.1.8 Materialien für die Agarosegelelektrophorese

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Tris	1.08382
	Borsäure	1.00165
	EDTA (0,5M,pH 8,0)	1.12029.1000
	Glycerin 87%	4094-1000
	Bromphenolblau	11746.005
	Ethidiumbromid, 1%ige Lösung	1.11608.0030
Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland	Xylencyanol FF Standard Fluka	95600
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	DNA-Marker VIII, Fragmente 19-1114 bp, 50 µg, 250µg/ml	1336045
Biozym Scientific GmbH, Hessisch- Oldendorf, Germany	Agarose	84.0004

Tabelle 11 : Materialien für die Agarosegelelektrophorese

### 2.1.1.9 Materialien für die Sequenzierung

Firma, Firmensitz	Produktname	Bestellnummer
Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, The Netherlands	Costar® Thermowell 96 Well Plate	6551
	Costar® 96 Well EIA/RIA Plate, Flat bottom without lid	3590
Agencourt Bioscience Corporation, Beverly MA, USA	SPRI®Plate 96R Magnetplatte	000219
	Ampure®	10829900
	CleanSEQ®	10983900
Merck KGaA, Darmstadt, Germany	Ethanol pro analysi	1.00983.1011
Beckman Coulter®, Krefeld, Germany	Quickstartkit GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing	P/N 608120
	GenomeLab™ Separation Buffer	608012

Tabelle 12 : Materialien für die Sequenzierung

### 2.1.2 Verwendete Geräte

Firma, Firmensitz	Name des Gerätes
Bachhofer, Reutlingen, Germany	Metallblock-Thermostat, Baujahr 1993, maximal 120°C
Hettich, Tuttlingen, Germany	Zentrifuge EBA 12, Typ 1000
	Bench-top Zentrifuge Rotanta TRC
Memmert, Schwabach, Germany	Brutschrank, Typ B10, minimal 25°C, maximal 70°C
PE Applied Biosystems, Norwalk, USA	GeneAmp® PCR System 9700 Cycler
Biometra, Göttingen,	UNO II Thermoblock Cycler



Germany	
Sartorius Laboratory, Göttingen, Germany	L310 Waage
Biotec-Fischer, Reiskirchen, Germany	Phero-Stab 324 Microcomputer 4 Channel
Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Germany	Gel-Fotoapparat, E.A.S.Y.
IKA® Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Germany	IKA®-Schüttler MTS2
Krups, Solingen, Germany	Mikrowelle Type 785
Beckmann Coulter®, Krefeld, Germany	CEQ™8800 Genetic Analysis System
Flow Laboratories, Meckenheim, Germany	Bio-Sicherheitswerkbank BSB 4A
Heraeus, Hanau, Germany	Cytoperm CO <sub>2</sub> -Wärme Inkubator

Tabelle 13 : Geräte

## 2.1.3 Verwendete Cyclerprogramme

### 2.1.3.1 PCR-Cyclerprogramme

Cyclerprogramm	Resi 1.P		Resi 2.P		HIV1	
Basenzahl des PCR-Produktes	bis 1500 Basen		500-1000 Basen		400-500 Basen	
Zyklenanzahl	10 Zyklen		30 Zyklen		30 Zyklen	
Denaturation initial	92°C	120 sec	92°C		92°C	300 sec
Denaturation pro Zyklus	92°C	10 sec	92°C	60 sec	92°C	30 sec
Annealing	50°C	30 sec	50°C	30 sec	55°C	60 sec
Elongation	68°C	120 sec	72°C	90 sec	72°C	60 sec
zusätzliche Zyklen	20 Zyklen					
Denaturation	92°C	10 sec				
Annealing	50°C	30 sec				
Elongation	68°C	120 sec				
Elongation letzter Zyklus	68°C	420 sec	72°C	420 sec	72°C	240 sec
Cooling	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle 14 : Verwendete Cyclerprogramme für die PCR

### 2.1.3.2 Cyclerprogramm für die Sequenzreaktion

Cyclerprogramm	CEQ-Sequenzreaktion (30 Zyklen)	
Denaturation	96°C	20 sec
Annealing	50°C	20 sec
Elongation	60°C	240 sec

Tabelle 15 : Cyclerprogramm für die Sequenzreaktion

## 2.1.4 Verwendete Software

### 2.1.4.1 HIV Sequence Database

Die HIV Sequence Database des Los-Alamos National Laboratory (LANL), USA, ist die größte Sammlung von SIV- und HIV- Sequenzen. Ebenfalls in der Datensammlung befinden sich Programme zur Analyse von Sequenzen.

Verwendet wurden:

1. Primalign: Mit Primalign lassen sich Nukleotidsequenzen (zum Beispiel Primer) einer Stelle im Referenzstamm HXB2 (Ratner, Fisher et al., 1987) zuordnen.
2. Sequence Locator: Mit Sequence Locator kann eine komplette Virussequenz der Standardsequenz HXB2 und seiner Nummerierung angepasst werden. Ebenfalls übersetzt das Programm die Nukleotidsequenz in Aminosäuren und zerschneidet die Aminosäurefolge in die HIV-Proteine.
3. RIP3: Mit RIP3 kann die phylogenetische Verwandtschaft von Virussubtypen und Rekombinationen detailliert in Prozentzahlen in einem Diagramm dargestellt werden.
4. Translate: Mit Translate können Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt werden.
5. Gene Cutter: Gene Cutter schneidet die Gene aus einer Virussequenz heraus.

### 2.1.4.2 Primer 3

<http://www.frodo.wi.mit.edu>

Die Software Primer 3 ermöglicht die Suche von geeigneten Primerpaaren innerhalb der eigenen, bereits sequenzierten HIV-Genomteile (Rozen & Skaletsky, 2000).

### 2.1.4.3 MEGA4

Die Software MEGA4 erstellt einen Phylogenetischen Baum anhand von eingegebenen Virussequenzen (Saitou & Nei, 1987; Tamura, Dudley et al., 2007; Tamura, Nei et al., 2004; Felsenstein, 1992).

### 2.1.4.4 Gap4

Das Computerprogramm Gap4 erstellt ein Alignment einer Konsensussequenz mit den sequenzierten Anteilen des HIV-Genoms (Bonfield, Smith et al., 1995).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Viruslastmessung

Die Viruslastmessung mit COBAS® TaqMan®, COBAS® Amplicor® von Roche Diagnostics und m2000rt® von Abbott erfolgte nach den Standardprotokollen der Hersteller.

### 2.2.2 Virusisolierung

#### 2.2.2.1 PBMC-Separation

Ficoll-Paque® wurde mit der gleichen Menge frischem Citrat- oder EDTA-Blut bei Raumtemperatur in 15 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 700 g bildete sich eine weißlich-gelbliche Interphase aus Lymphozyten und PBMCs zwischen dem oben gelegenen Plasma und dem unten gelegenen Erythrozyten/Granulozyten. Nach Abheben des Hauptanteils des Plasma wurde die Interphase mit einer sterilen Pipette in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt, in das 40 ml RPMI 1640 ohne fetales Kälberserum vorgelegt worden waren. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen durch schonendes Zentrifugieren bei 600 g 5 Minuten lang pelletiert.

#### 2.2.2.2 Kultivierung der PBMC

Spenderlymphozyten wurden aus Citratblut von HIV-negativen gesunden Labormitarbeitern gewonnen. Nach Ficoll-Separation wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in 5 ml Mix 1 (RPMI 1640 mit 10 % FKS, Glutamin, Penicillin/Streptomycin, IL-2 ) mit 50 µl PHA (Phytohämagglutinin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre stimuliert. Am nächsten Tag wurde PHA durch erneutes Zentrifugieren und Resuspendieren in Mix 1 ausgewaschen. Die Zellen wurden im Lauf von längstens zwei Wochen dem Virusisolierungsansatz portionsweise zugesetzt.

#### 2.2.2.3 CD8<sup>+</sup>T-Zelldepletion

Aus Citrat- oder EDTA-Blut des HIV-infizierten Patienten wurden PBMCs nach dem Ficoll-Verfahren gewonnen. Die Zellen wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß in

Puffer 1 (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung = PBS, pH 7,4; mit 0,1% FKS und 2 mM EDTA) aufgenommen und für 20 Minuten bei 4 °C und leichtem Schwenken mit paramagnetischen Polystyrol-Beads (25 µl Beads pro ml Blut) inkubiert, auf deren Oberfläche monoklonale Antikörper gegen CD8 fixiert waren (CD8 Positive Isolation Kit). Anschließend wurde das Gefäß mit der Zell/Beads-Suspension in einen Magnet-Separator eingespannt. Nach zwei Minuten hatten sich die Magnetbeads mit den daran gebundenen CD8<sup>+</sup>T -Zellen an die dem Magneten zugewandte Wandseite des Eppendorf-Gefäßes bewegt. Dann konnte das gesamte Volumen mit den verbliebenen PBMCs (vermindert um die CD8<sup>+</sup>T -Zellen) entnommen werden und in ein 15 ml Zentrifugengefäß, in dem 10 ml RPMI 1640 vorgelegt wurden, pipettiert werden. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Zentrifugieren (5 Minuten bei 600 g) pelletiert und in 5 ml Mix 1 mit PHA aufgenommen.

#### 2.2.2.4 Virusisolierung

CD8<sup>+</sup>T-Zell-depletierte Patienten-PBMCs wurden wie Spender-PBMCs in Mix 1 mit PHA über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurde PHA ausgewaschen und die Zellen in Mix 1 aufgenommen und während der folgenden Wochen zweimal wöchentlich im Mikroskop beobachtet. Bei Absinken der Zelldichte wurden 0,5 ml Spender-PBMCs zugegeben (Kokultivierung). Einmal wöchentlich wurde das Medium zu etwa zwei Dritteln ausgetauscht. Vom entnommenen Zellkulturmedium wurden im Bio3<sup>\*\*</sup>-Labor 50 µl mit 150 µl Viruslysepuffer (0,2 % Triton x-100) versetzt und nach 30 Minuten Einwirkzeit für den Virusantigentest in den Bio2-Bereich gebracht, wo die Probe bis zur Testung bei 4 °C gelagert wurde. Wenn der Antigentest ein positives Signal ergab, wurde der restliche Zellkulturüberstand im flüssigen Stickstoff konserviert. Von einer positiven Kultur wurden durch zellfreie Infektion mit 50 µl zentrifugiertem Zellkulturüberstand weitere Subkulturen auf Spender-PBMCs angelegt und diese nach Zunahme der Virusantigen-signals im flüssigen Stickstoff deponiert.

#### 2.2.2.5 Virusantigennachweis (HIV p24-Antigen)

Lysierter Zellkulturüberstand wurde im Enzygnost HIV Integral II Test nach Protokoll des Testherstellers getestet. Dieser ist als HIV-Suchtest der vierten Generation für den Nachweis von HIV-1/-2/-O-Antikörpern und von HIV p24-Antigen ausgelegt. Nachdem HIV-Antikörper in der Zellkulturprobe durch die Prozedur der

Zellseparation, CD8-Depletion und Kokultivierung mit Spender-PBMCs weit unter die Nachweisgrenze verdünnt sind, kann ein neu auftretendes Signal nur durch HIV p24-Antigen aus neu gebildeten Viruspartikeln stammen. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei ca. 20 pg HIV p24-Antigen, was etwa einer Konzentration von  $10^5$  Viruspartikeln pro ml entspricht.

### 2.2.3 Primerauswahl

Zu Beginn der Versuche wurden Primer aus der klinisch-virologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts verwendet, die an besonders stark konservierten Stellen des HIV-Genoms binden. Damit konnten Amplifikate im gag, pol und env-Bereich des HIV-1 direkt aus Plasma des Patienten erhalten werden. Anhand dieser Sequenzen wurde eine erste Zuordnung zu Subtyp F1 erstellt. Dann wurden mit dem Programm Primer3 neue Primer selektiert.

Dazu wurden bereits bekannte Genomteile mit einer Konsensussequenz, bestehend aus sämtlichen bekannten HIV-1-F1-Genomen, ergänzt und nach Eingabe der Sequenz Primerpaare gesucht, welche in Schmelztemperatur, geringer Ausbildung von Sekundärstrukturen und möglichst einmaligem Vorkommen im Genom ideal harmonierten, bei gleichzeitig möglichst über 50% Anteil der Basen G und C. Außerdem sollten die Primer möglichst wenig Tendenz zu einer Ausbildung von Dimeren zeigen, da dies zu einer Verringerung des Wirkungsgrades der PCR führen könnte.

Für die 1. PCR wurde hierbei ein Abstand der beiden Primer zueinander von 600-1000 Basen und für die 2. PCR ein Abstand von 400-900 Basen angestrebt. Die Position der Primer der 2. PCR musste sich innerhalb der Position der Primer der 1. PCR befinden.

Die so ermittelten Primer wurden mit dem Programm Primalign auf ihre Position im HXB2-Genom und nochmals auf ihr einmaliges Vorkommen überprüft.

### 2.2.4 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde zur Vorbereitung Proteinase K in 5 ml Elutionspuffer aufgenommen und in Aliquots à 510 µl bei -20°C gelagert. Außerdem wurde die Poly(A) Carrier-RNA in 500 µl Elutionspuffer gelöst und in Aliquots à 55 µl bei -20°C

gelagert. Der Inhibitor Removal Buffer und der Waschpuffer wurden mit den angegebenen Mengen absoluten Ethanols versetzt.

Kurz vor der Extraktion wurden ein Aliquot Poly(A) und ein Aliquot Proteinase K aufgetaut und Poly(A) mit 2,5 ml Bindepuffer versetzt.

Im Bio3\*\*-Labor wurde nun zur Denaturierung 200 µl Arbeitslösung vorgelegt und mit 200 µl Überstand aus der Kultur von MVP-30846 versetzt und sanft gemischt.

Nach der Denaturierung wurde das Isolat im Bio1-Labor weiterverarbeitet. Es wurde 50 µl Proteinase K zugegeben und wieder gemischt. Die Positiv-Kontrolle (HIV-1-M/B Stamm MVP-899) wurde nach gleichem Protokoll verarbeitet.

Diese Mischung wurde bei 72 °C für 10 Minuten im Heizblock inkubiert. Danach wurden 100 µl Bindepuffer hinzugegeben und die Probe wurde in das obere Reservoir des High Pure Filter-Tubes pipettiert, der auf ein Collection Tube gesetzt wurde. Es wurde bei 3000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, der Filter Tube in einen neuen Collection Tube gesetzt und 500 µl Inhibitor Removal Buffer in das obere Reservoir pipettiert. Wieder wurde bei 3000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Nach dem nächsten Verwerfen des Durchlaufes wurden 450 µl Waschpuffer in das obere Reservoir pipettiert und es wurde auf gleiche Art zentrifugiert. Beim zweiten Waschschrift wurde die gleiche Menge Waschpuffer hinzugegeben, allerdings wurde nun mit 3000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nun folgte ein Schritt zum Trockenschleudern, 5 Minuten mit 3000 g. Der Filter Tube wurde auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgesetzt und es wurden 50 µl Elutionspuffer (auf 72 °C vorgewärmt) hineingegeben. Nun folgte der letzte Zentrifugationsschritt, 3000 g für 3 Minuten.

Die isolierte RNA wurde linearisiert. Dazu wurde sie für 10 Minuten bei 65 °C im Wärmeblock inkubiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung in den Kühlschrank gestellt beziehungsweise bei -80 °C eingefroren, falls keine sofortige Weiterverarbeitung vorgesehen war.

## 2.2.5 Reverse Transkription

Mix:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
Linearisierte RNA	10
5x Puffer	4
DTT	2
5mM dNTP	2
3' Primer	2
Superscript	0,2
Insgesamt	20

Für die Reverse Transkription wurden die 3'Primer LSI<sub>GI</sub>, 3env155, H1env2 und env14J verwendet. Die cDNA wurde dann je nach Nähe zum zu amplifizierenden DNA-Stück ausgewählt.

Der Mix wurde eine bis zwei Stunden bei 45 °C im Brutschrank inkubiert. Die entstandene cDNA wurde anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert beziehungsweise bei -20 °C eingefroren, falls keine sofortige Weiterverarbeitung vorgesehen war.

## 2.2.6 PCR

Die PCR (Mullis, Faloona et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987; Saiki, Gelfand et al., 1988) wurde nach Standardprotokollen in zwei Schritten durchgeführt: 1. PCR (Expand Long Range PCR) und 2. PCR (nested PCR).

### 2.2.6.1 Expand Long Range PCR

Die gewonnene cDNA von Isolat MVP-30846 und vom Virus der Positiv-Kontrolle HIV-1-M/B Stamm MVP-899, sowie eine Negativ-Kontrolle (Aqua dest. statt cDNA) wurden in einen Mix eingesetzt.



Mix:

Reagenz	Menge in $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	32,8
10x PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	5
5'-Primer	2
3'-Primer	2
Expand Long Range Enzym	0,7
dNTP 10mM	2,5
cDNA	5
insgesamt	50

Dann wurde die PCR im Cycler mit dem Programm „Resi 1.P“ durchgeführt. Die PCR-Produkte (50  $\mu$ l) wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 2.2.6.2 Nested PCR mit Taq Polymerase

Die PCR-Produkte der Expand Long Range PCR von Isolat MVP-30846 und vom Virus der Positiv-Kontrolle HIV-1-M/B Stamm MVP-899, sowie von der Negativ-Kontrolle (Aqua dest. statt cDNA) wurden in einen Mix eingesetzt.

Mix:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	25
dNTP 1,25 mM	8
10x Puffer	5
5'-Primer	5
3'-Primer	5
Taq-Polymerase	0,4
Amplifikat 1. PCR	2
Insgesamt	50

Dann wurde die PCR im Cycler mit den Programmen „Resi 2.P“ oder „HIV1“, je nach Länge des gewünschten PCR-Produkts, durchgeführt. Die PCR-Produkte (50 $\mu\text{l}$ ) wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

## 2.2.7 Agarosegelelektrophorese

### 2.2.7.1 Herstellung von TBE-Puffer

Für die Herstellung von 10xTBE-Puffer (pH 7,5-7,8) wurden 540 g Tris, 275 g Borsäure und 37,2 g EDTA (0,5 M, pH 8,0) auf 5000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

### 2.2.7.2 Herstellung des Gels für die Agarosegelelektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben wurden pro 2-prozentiges Gel 1 g Agarose abgewogen und 50 ml 1xTBE-Puffer hinzugefügt. Diese Lösung wurde in der Mikrowelle bei maximaler Leistung bis zum kurzen Aufkochen erhitzt. In der Zwischenzeit wurde die Gelkammer mit Kamm und Spacer versehen. Damit die Lösung schnell abkühlte, wurde der Erlenmeyerkolben geschwenkt. Bei einer Temperatur von ca. 80°C wurden 2  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Lösung wurde zur Durchmischung mit dem Ethidiumbromid vorsichtig geschwenkt, um Luftblasenbildung zu vermeiden. Nun wurde die Lösung in die Kammer gegossen und restliche Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Nach Abkühlen und Polymerisation wurde das Gel

dann mit TBE-Puffer bedeckt und konnte im Kühlschrank ca. 1 Woche aufbewahrt werden.

#### 2.2.7.3 Herstellung von Bromphenolblaupuffer

Für die Herstellung von Bromphenolblaupuffer wurden 27,5 ml Glycerin 87 %, 5 ml 10x TBE, eine Spatelspitze Bromphenolblau, eine Spatelspitze Xylencyanol und 50 ml Aqua dest. vermischt.

#### 2.2.7.4 Auftragen der PCR-Amplifikate

Kapazität einer Kammer: 17 Taschen (15 Proben, 2 Marker)

Das Gel wurde kurz vor dem Auftragen aus dem Kühlschrank geholt. Kamm und Spacer wurden entfernt. 2 µl Bromphenolblaupuffer wurde in ein Tube einer 96-Well-Platte pipettiert. 8 µl des Amplifikats aus der nested PCR wurden hinzugegeben. Anschließend wurde diese Mischung in die Geltaschen gegeben. In die erste und letzte Tasche wurden 10 µl Marker VIII pipettiert.

#### 2.2.7.5 Auftrennung der Amplifikate und Photographie

Die Amplifikate wurden bei 85 V und 250 mA für 0,7 Stunden aufgetrennt, bis sich die blaue BPB-Bande kurz vor dem Ende des Gels befand. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert und die sichtbaren Banden wurden mit dem an der Seite aufgetragenen Marker verglichen, um die Anwesenheit des gewünschten PCR-Produkts zu überprüfen.

#### 2.2.8 DNA-Sequenzierung mit der Didesoxy-Methode

Falls bei der nested PCR das gewünschte Produkt auf dem Gel sichtbar war, wurde versucht, dieses Produkt zu sequenzieren (Sanger, 1981b; Sanger, 1981a).

##### 2.2.8.1 Erste Fällung

Es wurde 70-prozentiges Ethanol mit Aqua dest. hergestellt. Das PCR-Produkt (40 µl) wurde auf eine 96-Well-Platte übertragen. 72 µl AMPure (Suspension mit Metallkügelchen) wurden zu jeder Probe hinzugefügt und es wurde 2-3 Mal auf- und abpipettiert. Mit einer 8-Kanal-Pipette wurde die Mischung 10 Mal auf- und abpipettiert, bis sie homogen aussah. Die Mischung wurde für 7 Minuten inkubiert.

Danach wurde die 96-Well-Platte in die SPRI®Plate gestellt. Nach 10 Minuten wurde die Flüssigkeit aus jedem Well entfernt. Es blieb nur noch ein Ring aus Metallkügelchen übrig. Es wurden 200 µl 70-prozentiges Ethanol hinzugegeben und es wurde 60 Sekunden inkubiert. Das Ethanol wurde wiederum abpipettiert und dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Dabei wurde auf das Entfernen sämtlicher Ethanolreste geachtet. Nach Entnahme aus der SPRI®Plate musste die Platte 20 Minuten bei Raumluft trocknen. Zuletzt wurden 40 µl Aqua dest. hinzugegeben und es wurde 10 Mal auf- und abpipettiert, um die DNA zu eluieren. Die Reaktionsplatte wurde noch einmal in die Metallplatte gestellt, die Metallkügelchen wurden zur Wand gezogen. Die eluierte Probe konnte aus der Reaktionsplatte in ein Eppendorfgefäß übertragen werden. Das Eluat wurde nochmals in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um die Intensität der DNA-Bande abschätzen zu können.

#### 2.2.8.2 Sequenzreaktion

Alle Reagenzien wurden im Kühlblock bei 4 °C gekühlt und in der angegebenen Reihenfolge pipettiert.

Mix:

Reagenz	Menge in µl
Aqua dest.	DNA und Aqua dest. zusammen 5,5
DNA (Eluat der 1. Fällung)	
Primer (5pmol/µl)	0,5
DCTS Quick Start Master Mix	4
Insgesamt	10

Je nach Leuchtintensität der Gelbande bei der Agarosegelelektrophorese wurden zwischen 0,5 µl und 5,5 µl Eluat in die Sequenzreaktion eingesetzt und die Differenz zu 5,5 µl mit Aqua dest. ergänzt.

Der Mix wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt, in den Cycler gestellt und mit dem Programm „Sequenzreaktion“ amplifiziert.

#### 2.2.8.3 Zweite Fällung

85-prozentiges Ethanol wurde mit Aqua dest. hergestellt und Sample Loading Solution (SLS, 40 µl pro Probe) wurde im Dunkeln aufgetaut.

Die Probe aus der Sequenzreaktion (10 µl) wurde auf die 96-Well-Platte übertragen, es wurden 10 µl CleanSEQ zu jeder Probe hinzugefügt und es wurde zum Mischen 2-3 Mal auf- und abpipettiert. 42 µl 85-prozentiges Ethanol wurde mit der 8-Kanal-Pipette hinzugegeben und es wurde 7 Mal auf- und abpipettiert.

Die 96-Well-Platte wurde auf die SPRI®Plate gestellt und 5 Minuten inkubiert, die Metallkügelchen mit der DNA trennten sich von der Flüssigkeit. Diese Flüssigkeit wurde nun aus den Wells entfernt, wobei der Metallkügelchen-Ring an der Wand der Wells nicht verletzt werden durfte. Nochmals wurden 100 µl 85-prozentiges Ethanol hinzugegeben und es wurde 60 Sekunden gewartet. Das Ethanol wurde wieder unter Mitnahme sämtlicher Reste entfernt.

Die 96-Well-Platte wurde von der SPRI®Plate genommen und für 10 Minuten getrocknet. Nun mussten 40 µl SLS hinzugefügt werden und die Proben mussten mit Alufolie abgedeckt werden. Auf einem Schüttler wurden die Proben für 7 Minuten eluiert. Die SPRI®Plate wurde mit einem Blatt Papier abgedeckt und die 96-Well-Platte für 3 Minuten daraufgestellt, damit die Metallkügelchen sich zum Boden des Wells bewegten.

Zum Schluss wurde ein Tropfen Mineralöl zu jeder Probe hinzugegeben, die Wells der EIA/RIA-Platte zu  $\frac{3}{4}$  mit Separation Buffer gefüllt und beide Platten wurden in den Sequencer gestellt.

#### 2.2.8.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach Standardprotokoll mittels Dye-Di-Deoxy-Terminator-Cycle-Sequencing durchgeführt.

#### 2.2.9 Übertragen der Ergebnisse in Gap4

Nach Erhalt der Ergebnisse wurden diese in das Computerprogramm Gap4 eingefügt und mit einer Konsensus-Sequenz aus allen bekannten HIV-F1-Genomen verglichen, da erste erhaltene Sequenzabschnitte auf einen Subtyp HIV-1-F1 hindeuteten. So konnte die korrekte Stelle einer Sequenz im Genom ermittelt werden. Ebenfalls konnte jederzeit eine neue Konsensus-Sequenz mit den

integrierten neu ermittelten Sequenzen erstellt werden. Mit dem Programm Primer3 konnten dann neue Primer gesucht werden.

Nach Erhalt der vollständigen Sequenz konnten außerdem die Aminosäuresequenzen, die sich aus der Nukleinsäuresequenz ergaben, auf Stopp-Kodons und die Vollständigkeit der Gene im jeweiligen Leseraster überprüft werden.

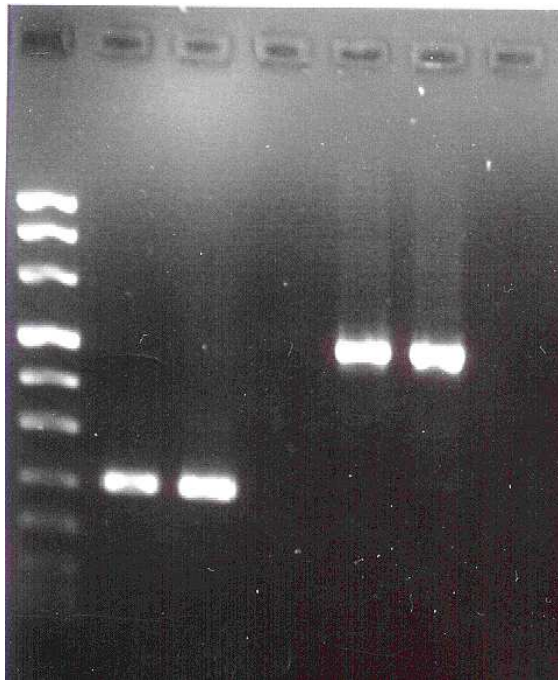
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der PCR

Die mit der PCR gewonnenen Amplifikate konnten zusammen mit den Kontrollen (Positiv-Kontrolle HIV-1-M/B MVP 899, Negativ-Kontrolle Aqua dest.) im Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert werden.

Im Wesentlichen waren alle PCR-Versuche erfolgreich. Nur vereinzelt war eine Anpassung der  $MgCl_2$ -Konzentration für das Funktionieren der Amplifikation notwendig. Ebenfalls war es einige Male nötig, die PCR zu wiederholen, um mehr PCR-Produkt zu erhalten. Dabei wurden aber keine Arbeitsschritte bzw. Reagenzien verändert.

Einige Primerpaare amplifizierten gleichermaßen das Isolat MVP-30846 und die Positiv-Kontrolle.

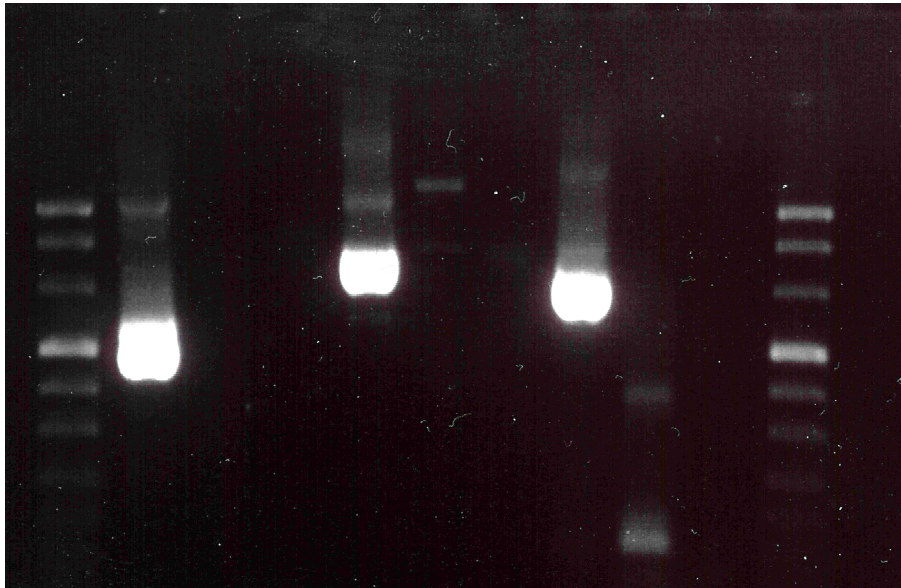


Negativ-Kontrolle	Primer
Positiv-Kontrolle	gag3J und
Isolat MVP-30846	gag4J
Negativ-Kontrolle	
Positiv-Kontrolle	Primer
Isolat MVP-30846	gag1J und
Marker VIII	gag2J

Abbildung 6 : Agarosegelelektrophorese der Amplifikate mit Isolat MVP-30846 und Positiv-Kontrolle

Bestimmte Primerpaare (zum Beispiel vif3 und vif4) amplifizierten nur Isolat MVP-30846. Die HIV-1-B-Positivkontrolle konnte nicht oder nur sehr schwach amplifiziert werden.



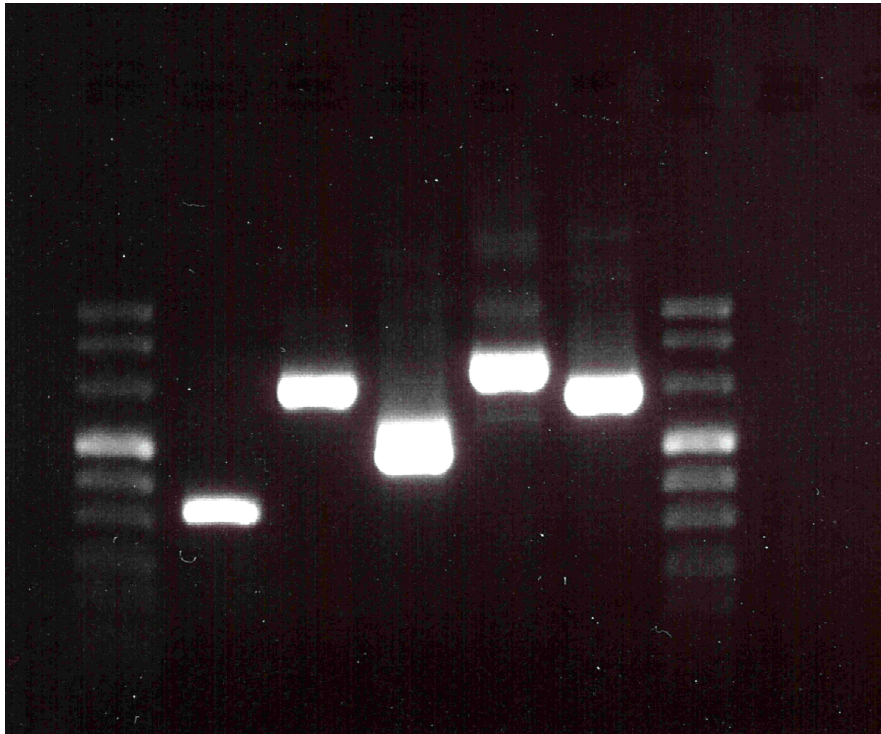


Marker VIII		
Negativ-Kontrolle	Primer	
Positiv-Kontrolle	polvi3	
Isolat MVP-30846	und polvi4	
	4	
Negativ-Kontrolle	Primer	
Positiv-Kontrolle	vifenv3	
Isolat MVP-30846	und	
	vifenv4	
Negativ-Kontrolle	Primer	
Positiv-Kontrolle	vif3 und	
Isolat MVP-30846	vif4	
Marker VIII		

Abbildung 7 : Agarosegelelektrophorese der Amplifikate mit Isolat MVP-30846: Die Positiv-Kontrolle wurde nicht amplifiziert

### 3.2 Ergebnisse der ersten Fällung

Eine Kontrolle der Aufreinigung der Amplifikate erfolgte nach der ersten Fällung. Die Eluate wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das Bild dieser Auftrennung erlaubte eine Aussage über die Qualität der Aufreinigung und auch eine Abschätzung der Leuchtintensität der Bande. Je nach Leuchtintensität wurde mehr oder weniger DNA für die Sequenzreaktion benötigt.



Marker VIII  
 env7J und env8J  
 pol1J und pol2J  
 vi3 und vi4  
 vifenv3 und vifenv4  
 polvif 3 und polvif 4  
 Marker VIII

Abbildung 8 : Agarosegel mit den Eluaten der 1. Fällung (Primerkombinationen der Eluate in der Tabelle)

### 3.3 Ergebnisse der Sequenzierung

Nach der Sequenzierung wurde die Qualität der Sequenzen überprüft, die sich in der Signalintensität und in der Reinheit der Signale zeigte. Die Reinheit der Signale zeigt sich dadurch, dass in einer qualitativ guten Sequenz nur eine Base pro Sequenzstelle angezeigt wird.

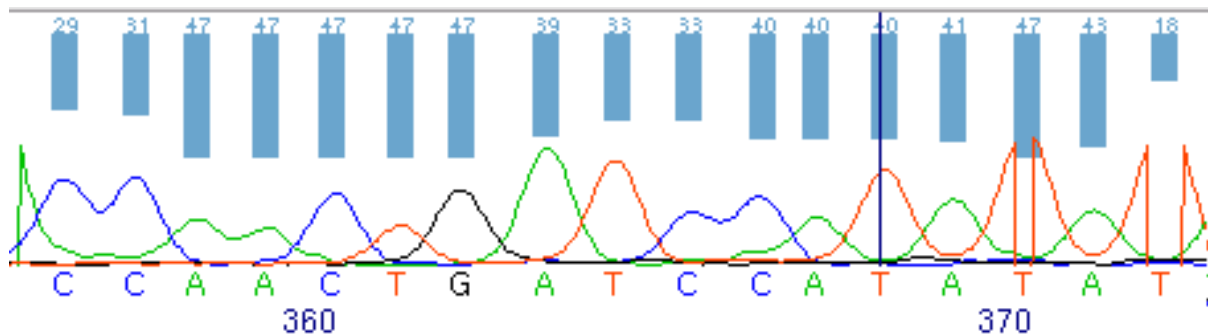


Abbildung 9 : Screenshot aus dem Computerprogramm Gap4: Qualitativ gute Sequenz, nur eine Base pro Sequenzstelle (nur ein farbiger Peak)

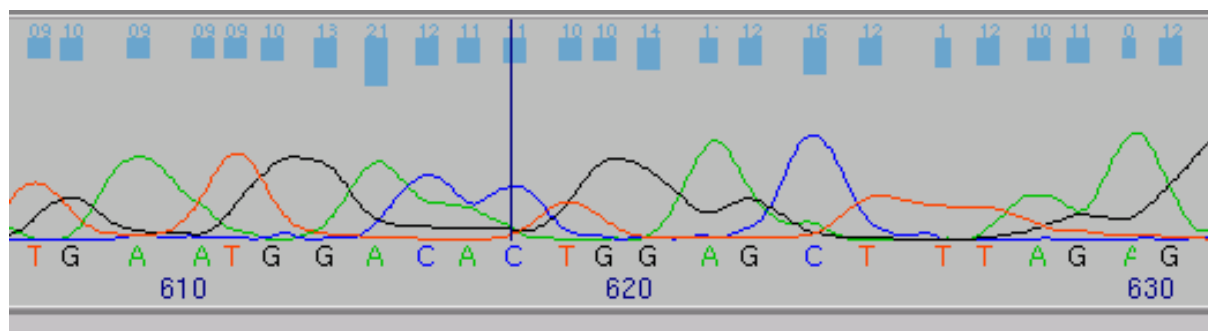


Abbildung 10 : Screenshot aus dem Computerprogramm Gap4: Qualitativ schlechte Sequenz, mehrere mögliche Basen pro Sequenzstelle (mehrere farbige Peaks)

Die qualitativ guten Sequenzen wurden mithilfe des Programms Gap4 und einer Konsensussequenz, bestehend aus allen verfügbaren HIV-1-M/F1-Sequenzen, der richtigen Stelle im Genom zugeordnet. So ergab sich eine Sequenz aus bereits sequenzierten Anteilen des Virusgenoms und Anteilen, an denen nur die Konsensussequenz zur Verfügung stand.

Bei Abschluss der Versuche war jede Stelle des Genoms mindestens ein Mal in beiden Richtungen, jedoch meist mehrmals sequenziert worden, um die Richtigkeit der Sequenzierung so weit wie möglich zu garantieren.

Der Screenshot aus dem Programm Gap4 zeigt die verschiedenen Abschnitte, die im Laufe der Arbeit sequenziert worden sind, dabei steht ein roter Pfeil jeweils für eine erfolgreiche Sequenz.

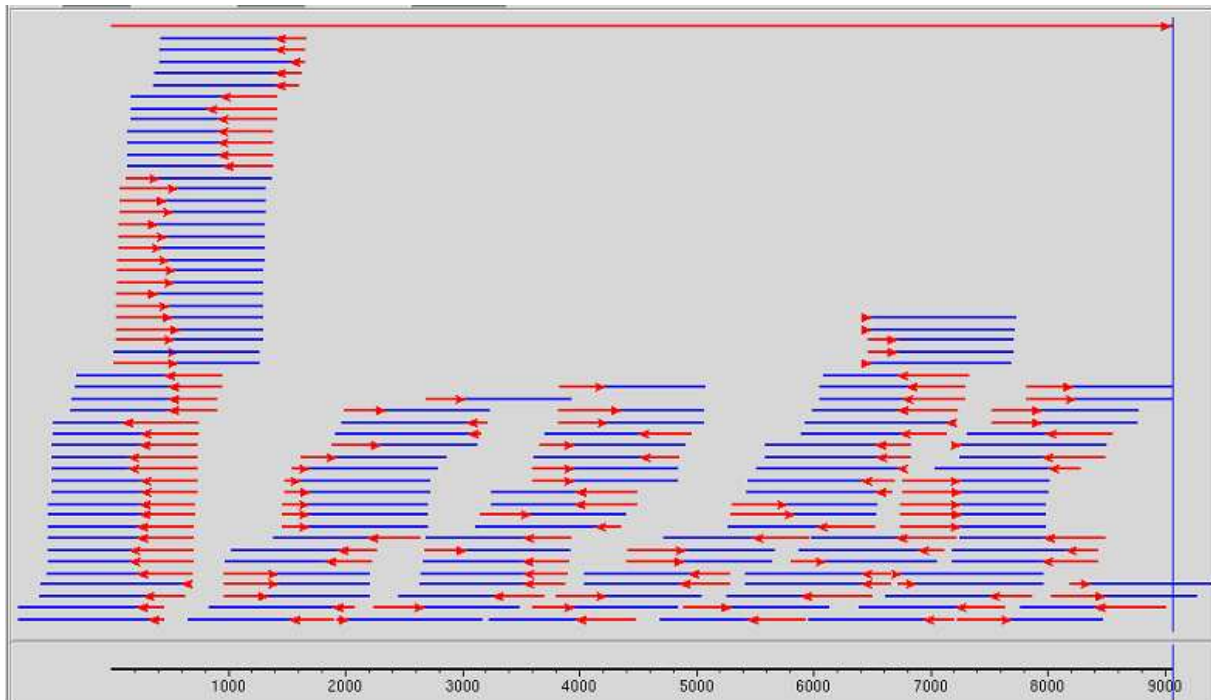


Abbildung 11 : Screenshot aus dem Computerprogramm gap4:  
 x-Achse: Genomlänge in Basenpaaren  
 rote Pfeile: Qualitativ gute Sequenzen  
 blaue Linien: volle Länge der Sequenzen

### 3.4 Bearbeitung der Sequenz mit Computerprogrammen

Nach Erhalt der vollständigen Sequenz von MVP-30846 wurde sie mit verschiedenen Computerprogrammen analysiert, um eine mögliche Erklärung für das Versagen des COBAS® TaqMan® und des COBAS® Amplicor® Viruslasttests zu finden. Dazu wurden Programme des Internetportals <http://www.hiv.lanl.gov> verwendet.

#### 3.4.1 Phylogenetischer Baum

Um eine erste Einordnung des Virusstamms MVP-30846 vorzunehmen, wurde zunächst ein phylogenetischer Baum erstellt. Anhand dieses Baums lässt sich die Verwandtschaft zwischen Sequenzen von verschiedenen Subtypen (A, B, C, D, F, G, J, K) aus der HIV-1-M-Gruppe und MVP-30846, zum Beispiel im pol-Bereich, determinieren. Es zeigte sich, dass MVP-30846 am nächsten mit Viren des Subtyps F1 verwandt ist und es sich also höchstwahrscheinlich um ein HIV-1-M/F1-Virus oder um ein rekombinantes Virus mit F1-Anteilen handelt. Allerdings kann man anhand dieses Stammbaums auch feststellen, dass die Ähnlichkeit von MVP-30846 und den anderen F1-Sequenzen nicht besonders groß ist.

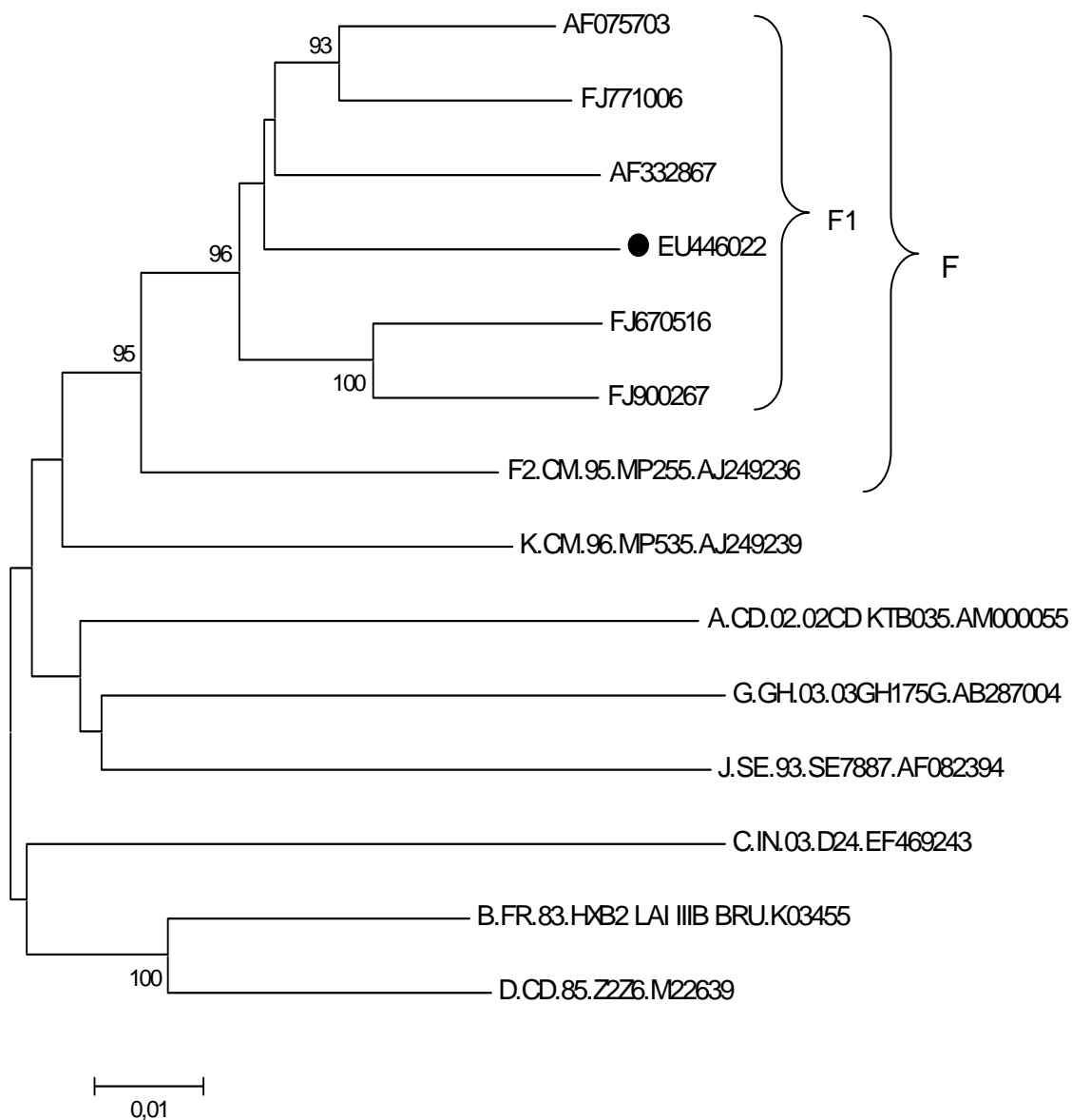


Abbildung 12 : Phylogenetischer Baum vom pol-Gen. MVP-30846 (in der Abbildung genannt EU 446022) und andere F1-Sequenzen im Vergleich zu F2 und den Genotypen A-K

Die evolutionäre Verwandtschaft wurde mit der Neighbor-Joining Methode im Programm MEGA4 berechnet. Der Bootstrap-Konsensus Stammbaum aus 1000 Replikaten veranschaulicht die evolutionäre Beziehung der untersuchten Sequenzen. Die Zahlen geben den Prozentwert an, mit dem im Bootstrap-Verfahren dasselbe Aufzweigungsmuster auftrat. Die Distanzen wurden mittels Maximum Composite Likelihood Methode berechnet. Hierbei wurden alle Kodonpositionen mit einbezogen, Gaps wurden eliminiert. Insgesamt wurden 2838 Positionen aus dem pol-Genbereich verwendet

Ein zweiter phylogenetischer Baum zeigt die Verwandtschaft von MVP-30846 mit verschiedenen F1-Subtyp-Genomen. Für die Erstellung dieses Baums wurden die kompletten Genome von 25 Subtypen (8009 Basen) miteinander verglichen. F1.BE.VI850 scheint der nächste Verwandte von MVP-30846 zu sein

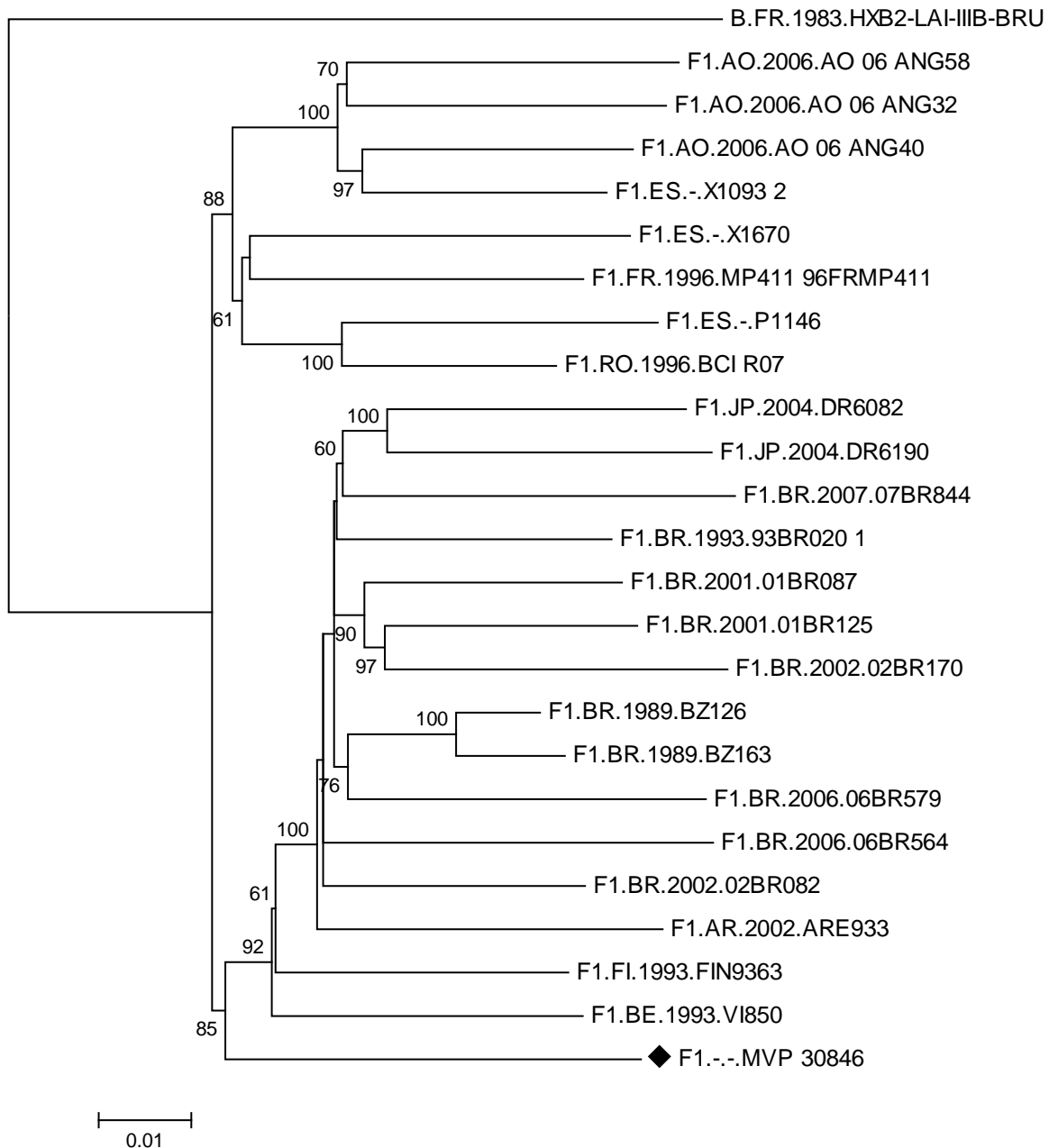


Abbildung 13 : Phylogenetischer Baum mit Darstellung der Verwandtschaft zwischen Konsensussequenzen von 25 HIV1-M-F1-Subtypen und MVP-30846 (8009 Basen)  
 Die evolutionäre Verwandtschaft wurde mit der Neighbor-Joining Methode im Programm MEGA4 berechnet. Der Bootstrap-Konsensus Stammbaum aus 1000 Replikaten veranschaulicht die evolutionäre Beziehung der untersuchten Sequenzen. Die Zahlen geben den Prozentwert an, mit dem im Bootstrap-Verfahren dasselbe Aufzweigungsmuster auftrat. Die Distanzen wurden mittels Maximum Composite Likelihood Methode berechnet. Hierbei wurden alle Kodonpositionen mit einbezogen, Gaps wurden eliminiert. Insgesamt wurden 8009 Positionen aus dem gesamten Genbereich verwendet

### 3.4.2 RIP3-Analyse

Die Analyse des Virusgenoms mit dem Programm RIP ermöglichte eine genaue Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft des Virus und eine präzise

Darstellung des Verwandtschaftsgrades in den verschiedenen Abschnitten des Virusgenoms.

### 3.4.2.1 Vergleich von MVP-30846 mit HIV-1-M-Konsensussequenzen

In einer ersten Analyse wurde das Isolat MVP-30846 mit verschiedenen Konsensussequenzen (Konsensus A1, B, C, D, F1, F2, G, H) der HIV-1-Gruppe verglichen. Dazu kreiert das Programm ein 400 Basen großes Fenster, das jeweils um eine Base nach hinten versetzt wird. Jedes 400 Basen große Fenster von MVP-30846 wird dann mit den korrespondierenden Basen der Konsensussequenzen verglichen. Die Ähnlichkeit von MVP-30846 wird dann, auf einem Diagramm aufgetragen, dargestellt. Jeder Punkt auf dem Diagramm repräsentiert also die Distanz zu anderen Sequenzen des jeweiligen 400 Basen großen Fensters von MVP-30846.

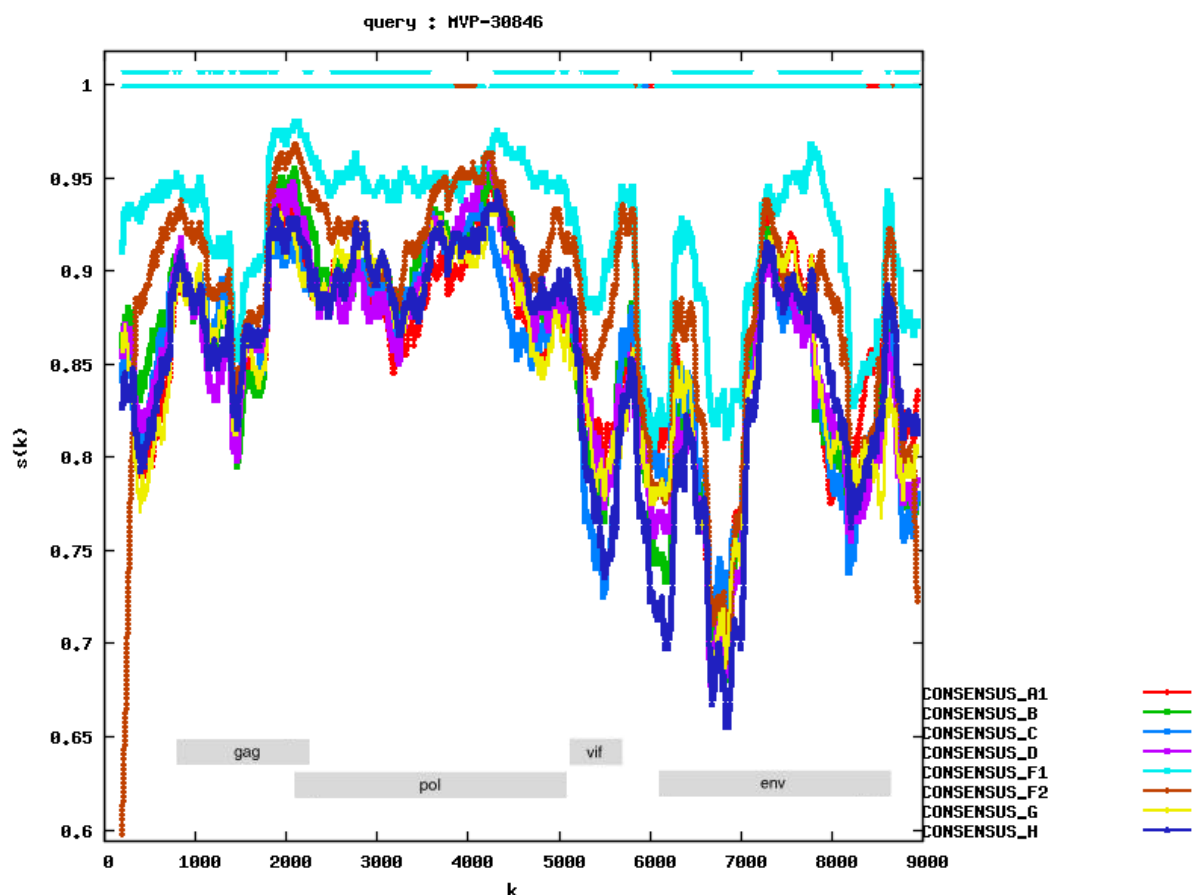


Abbildung 14 : Ähnlichkeit von Isolat MVP-30846 mit HIV-1/M-Konsensussequenzen

Parameter: Fenstergröße 400 Basen, Signifikanz 95%

y-Achse  $s(k)$ : Ähnlichkeit der Sequenzen mit der zu analysierenden Sequenz (Maximalwert:1)

x-Achse: Genomlänge in Basen

1. Linie (oberer Bereich des Diagramms): Farbliche Darstellung der Sequenz mit der größten Ähnlichkeit zu MVP-30846, signifikant ähnlicher als Sequenz mit der zweitgrößten Ähnlichkeit
2. Linie (oberer Bereich des Diagramms): Farbliche Darstellung der Sequenz mit der größten Ähnlichkeit zu MVP-30846



Auch mithilfe dieser Darstellung zeigte sich, dass MVP-30846 am nächsten mit HIV-1-M/F1-Viren verwandt ist. Außerdem scheint das Virus in bestimmten Sequenzteilen einzigartig und sehr verschieden von anderen bekannten Sequenzen zu sein, da die nächstverwandte bekannte Sequenz in gewissen Abschnitten nur über eine 85-prozentige Ähnlichkeit verfügt.

### 3.4.2.2 Vergleich von MVP-30846 mit F1-Konsensussequenzen

Um die Ähnlichkeit von Isolat MVP-30846 mit bestimmten bekannten HIV-1-M/F1-Sequenzen zu analysieren, wurde eine weitere RIP3-Analyse durchgeführt.

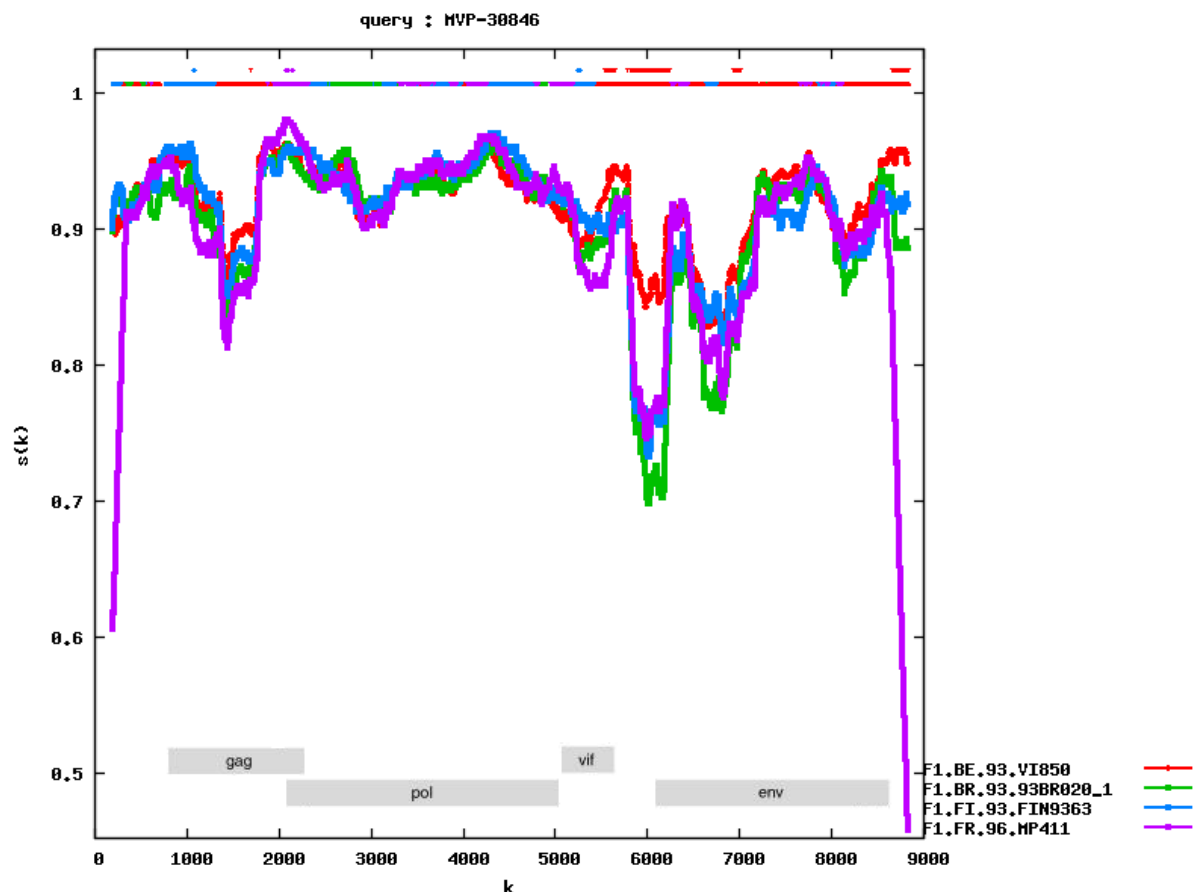


Abbildung 15 : Ähnlichkeit von Isolat MVP-30846 mit HIV-1/F1-Sequenzen

Parameter: Fenstergröße 400 Basen, Signifikanz 95%

y-Achse  $s(k)$ : Ähnlichkeit der Sequenzen mit der zu analysierenden Sequenz (Maximalwert:1)

x-Achse: Genomlänge in Basen

1. Linie (oberer Bereich des Diagramms): Farbliche Darstellung der Sequenz mit der größten Ähnlichkeit zu MVP-30846, signifikant ähnlicher als Sequenz mit der zweitgrößten Ähnlichkeit
2. Linie (oberer Bereich des Diagramms): Farbliche Darstellung der Sequenz mit der größten Ähnlichkeit zu MVP-30846

Diese Analyse vergleicht Isolat MVP-30846 mit einzelnen bekannten HIV-1-M/F1-Sequenzen. Sie zeigte, dass das Virus an verschiedenen Stellen in seinem Genom



anderen F1-Virusgenomen sehr ähnlich ist (zum Beispiel Virus F1.FR.96.MP411 bei Basennummer 2000 - nach HXB2 - um bis zu 98%). Allerdings ist das Virusgenom zwischen den Basennummern 5000 und 7000 als sehr individuell anzusehen. Dieser Bereich entspricht dem kodierenden Bereich env, der die genetische Information für die Hüllproteine enthält. Die größten genetischen Unterschiede zwischen Virusstämmen befinden sich dort, weil durch die Bildung von Antikörpern gegen die Virushülle im infizierten Individuum der Selektionsdruck auf die env-Gene erhöht wird. Gleichzeitig müssen die Hüllproteine aber nicht so stark konserviert werden wie Enzyme, da ihre Funktionalität durch Mutationen nicht so sehr eingeschränkt wird. Auffällig ist dabei aber, dass an bestimmten Stellen, an denen das Virus ein besonders individuelles Genom zu haben scheint (Absinken der prozentualen Ähnlichkeit bis ca. 85%), ein Virus immer eine nähere Verwandtschaft aufweist als alle anderen Virusgenome: Auch in der RIP3-Analyse scheint F1.BE.93.VI850 der nächste bekannte Verwandte von Isolat MVP-30846 zu sein.

### **3.5 Besondere Auffälligkeiten im Virusgenom**

Um das Virusgenom weiter zu analysieren, wurde es mit der F1-Konsensussequenz im Computerprogramm gap4 und mit der Referenzsequenz HXB2 im Programm Sequence Locator verglichen. Es wurde vor allem auf Insertionen oder Deletionen von mehreren Aminosäuren geachtet.

Dabei fiel ein Bereich bei ca. Basennummer 2200 mit einer Deletion von 6 Aminosäuren auf. An dieser Stelle überschneiden sich das Ende von gag und der Anfang von pol, sodass von der Deletion sowohl das Gen p6, das für ein Link-Protein kodiert, das eine Verbindung zwischen Kapsid und Membran herstellt, und GagPolTF (GagPol TransFrame), auch p6\* genannt, das den Übergang zur Protease bildet, betroffen sind.

### 3.5.1 Vergleich des Genoms von MVP-30846, Konsensus F1 und HXB2 auf Höhe der Deletion

Die Deletion befindet sich zwischen 2199-2240 (Basennummerierung nach HXB2) und umfasst 18 Basen.

Name	Nukleinsäuresequenz
MVP-30846	CC CTC TCG GGA ACA GGA GCA --- --- --- --- --- --- --- CCC TCC CT
HXB2	CC CCC TCA GAA GCA GGA GCC GAT AGA CAA GGA ACT GTA TCC TTT AA
Konsensus F1	CC CTC TCC GAA GCA GGA GCA GAA AGA CGA GGG ACT GTA CCC TCC CT

Tabelle 16 : Nukleinsäuresequenzen von MVP-30846, HXB2 und der F1-Konsensussequenz bei 2199-2248 Basenpaaren (nach HXB2). Die Transkription dieser Nukleinsäuren-Triplets entspricht dem GagPolTF/p6\*-Frame.

Name	Nukleinsäuresequenz
MVP-30846	CCC TCT CGG GAA CAG GAG CAC --- --- --- --- --- --- --- CCT CCC T
HXB2	CCC CCT CAG AAG CAG GAG CCG ATA GAC AAG GAA CTG TAT CCT TTA A
Konsensus F1	CCC TCT CCG AAG CAG GAG CAG AAA GAC GAG GGA CTG TAC CCT CCC T

Tabelle 17 : Nukleinsäuresequenzen von MVP-30846, HXB2 und der F1-Konsensussequenz bei 2199-2248 Basenpaaren (nach HXB2). Die Transkription dieser Nukleinsäuren-Triplets entspricht dem p6-Frame.

### 3.5.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von MVP-30846, Konsensus F1 und HXB2 auf Höhe der Deletion

Name	Aminosäuresequenz
MVP-30846	FFREDL AFQQGE AREFPS EQTRAN SPASRE LRVQRG DDP*LS ***** GTGAPS LGF
HXB2	FFREDL AFLQ GK AREFSS EQTRAN SPTRE LQVWGR DNNSPS EAGADR QGTVSF *NF
Konsensus F1	FFRENL AFQQGE ARKFPS EQTRAN SPASRE LRVQRG DNP*LS EAGAER RGTVPS LSF

Tabelle 18 : Aminosäuresequenzen von MVP-30846, HXB2 und der F1-Konsensussequenz des Proteins GagPolTF/p6\*  
Stern: fehlende Aminosäure

Name	Aminosäuresequenz
MVP-30846	LQSRPE PTAPPA ESFGFR EEMTPS REQEH* *****P PLDSLRL SFGSD P*S**
HXB2	LQSRPE PTAPPE ESFRSG VETTP P QKQEP IDKELY PLTSLR SFGND PSSQ
Konsensus F1	LQNRPE PTAPPA ESFGFR EETTPS PKQEQK DEGLYP PLASLK SFGND P*SQ*

Tabelle 19 : Aminosäuresequenzen von MVP-30846, HXB2 und der F1-Konsensussequenz des Proteins p6  
Stern: fehlende Aminosäure

### 3.6 Vergleich des Virusgenoms mit Primern und Detektionssonde des COBAS® Amplicor® Viruslasttests

Um den Grund für die Unterquantifizierung von Isolat MVP-30846 mit dem COBAS® Amplicor® herauszufinden, wurden die Nukleinsäuresequenz des Virus mit den Primern und der Detektionssonde vom COBAS® Amplicor® verglichen.

In einer neuen Publikation beschrieben Drexler et al. eine Unterquantifizierung von bestimmten Virussubtypen in Brasilien durch den COBAS® Amplicor®-Viruslasttest, wobei insbesondere F-, BF-, C- und CF-Subtypen betroffen waren. Außerdem waren zwei Subtyp-F-Viren durch diesen Test gar nicht erkannt worden.

Nach näherem Vergleich des Virusgenoms mit den Primern und der Detektionssonde aus dem COBAS® Amplicor®-Viruslasttest (Drexler, de Souza Luna et al., 2007), zeigte sich, dass in Isolat MVP-30846 an den Bindungsstellen der Detektionssonde und des Antisense Primers dieselben Mutationen vorliegen, die auch bei den untersuchten Isolaten aus der Veröffentlichung von Drexler et al. zu einem Scheitern des Tests führen. Die folgende Abbildung zeigt die entsprechenden Sequenzen des Tests und von Isolat MVP-30846.

#### Sense Primer SK102

Name	Sequenz
COBAS® Amplicor®	AGT GGG GGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT
Isolat MVP-30846	... .. T... ..

#### Detektionssonde SK102

Name	Sequenz
COBAS® Amplicor®	GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GAT
Isolat MVP-30846	..C ..T ... ..A ... ..C

#### Antisense Primer SKCC1B

Name	Sequenz
COBAS® Amplicor®	GGA AGT GAC ATA GCA GGA ACT ACT AGT A
Isolat MVP-30846	..C ... ..T ... ..A ... ..

Tabelle 20 : Vergleich von Sense und Antisense Primer sowie der Detektionssonde des COBAS® Amplicor®-Viruslasttests mit der Nukleinsäuresequenz des Genoms von Isolat MVP-30846

### 3.7 Vergleich des Virusgenoms mit dem Amplicon des COBAS® TaqMan® Viruslasttests

Ebenfalls wurde das Genom von Isolat MVP-30846 mit den Primern vom COBAS® TaqMan® verglichen. Allerdings ist von diesem Test nur das Amplicon (Sequenz der Primer inklusive der amplifizierten Sequenz zwischen den Primern mit enthaltener Detektionssonde) bekannt, das von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Albert Heim, Virologie Hannover, sequenziert werden konnte und unter der Accessionnummer AM922506 bei der GenBank hinterlegt ist. Das Amplicon befindet sich in Position 1359-1595 nach HXB2 (Korn, Weissbrich et al., 2009). Dies ist dieselbe Stelle, an der sich auch die Primer und die Detektionssonde des COBAS® Amplicor® befinden. Das 5'-Ende des COBAS® Amplicor®-Amplicons endet an der gleichen Position wie das 5'-Ende des COBAS® TaqMan®-Amplicons, am 3'-Ende ist das COBAS® TaqMan®-Amplicon 2 Basen länger. Das COBAS® TaqMan®-Amplicon wird im Folgenden mit der Sequenz von MVP-30846 verglichen, fett markiert sind der Reihenfolge nach Sense Primer, Detektionssonde und Antisense Primer des COBAS® Amplicor®.

Name	Position	Sequenz
Amplicon	1359-1394	<b>AGT GGG GGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT GTT AAA</b>
MVP-30846	1359-1394	... .. T.. ... ..
Amplicon	1395-1430	<b>AGA GAC CAT CAA TGA GGA AGC TGC AGA ATG GGA TAG</b>
MVP-30846	1395-1430	... C.. T.. ... .. A.. ... .. C..
Amplicon	1431-1466	<b>ATT GCA TCC AGT GCA TGC AGG GCC TAT TGC ACC AGG</b>
MVP-30846	1431-1466	... A.. ... .. .G. CC. ... ..
Amplicon	1467-1502	<b>CCA GAT GAG AGA ACC AAG GGG AAG TGA CAT AGC AGG</b>
MVP-30846	1467-1502	... .. G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T..
Amplicon	1503- 1515	<b>AAC TAC TAG TAC C</b>
MVP-30846	1503-1515	... A.. ..G .

Tabelle 21 : Alignment von Isolat MVP-30846 und des Amplicons vom COBAS® TaqMan®-Viruslasttest zwischen 1359 und 1515 Basenpaaren (nach HXB2), in fetter Schrift der Reihenfolge nach Sense Primer, Detektionssonde und Antisense Primer des COBAS® Amplicor®-Viruslasttests

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodisches Konzept

#### 4.1.1 Strategie der PCR-Amplifikation mit nested PCR

Die PCR-Amplifikation mithilfe von Expand Long Range PCR und nested PCR bietet den Vorteil einer sehr starken Amplifikation, sodass selbst aus Plasmaproben mit einer geringen Viruskonzentration eine genügend hohe Amplifikation für die spätere Sequenzierung von Teilen des HIV-Genoms erreicht werden kann.

Allerdings gibt es auch einige Nachteile dieser hohen Amplifikation: Bei sehr geringen Viruskonzentrationen in Plasmaproben steigt das Fehlerrisiko durch fehlerhaften Einbau von Nukleinsäuren in der Expand Long Range PCR. Um diesen Fehler zu verkleinern und um genügend Material für die Sequenzierung des kompletten Virus zu haben wurde das Patientenvirus kultiviert. Die Viruskonzentrationen in der Kultur waren so hoch, dass ein fehlerhafter Nukleinsäureeinbau durch die korrekte Synthetisierung der anderen Stränge kompensiert wurde.

Um technische Sequenzierfehler so gering wie möglich zu halten, ist eine genaue Ergebniskontrolle der Sequenzen erforderlich, zum Beispiel durch mehrmaliges Sequenzieren des gleichen Genomabschnitts aus verschiedenen Amplifikaten.

#### 4.1.2 Strategie der Amplifikation aus Patientenplasma oder Kulturüberstand

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Viren zu sequenzieren: Einerseits kann man aus Patientenplasma oder aus Kulturüberstand gewonnenes Virus direkt nach PCR-Amplifikation sequenzieren. Da in Patientenplasma oder Kulturüberstand immer viele verschiedene Klone enthalten sind, die sich mehr oder weniger unterscheiden, wird solch eine Sequenzierung immer den Durchschnitt sämtlicher in der Probe enthaltener Klone abbilden.

Andererseits wäre es auch möglich, einen einzelnen Klon (Tan, Kang et al., 2007) aus einer Probe zu isolieren, ihn in ein Bakterienplasmid zur Amplifikation einzufügen, das Plasmid in den Bakterien (z.B. E. Coli) zu vermehren und dann die Plasmid-DNA zu sequenzieren. In diesem Fall erhält man das Genom eines einzigen Virusklons (das Standardgenom HXB2 ist das Genom eines Virusklons).

Für diese Arbeit war es wichtiger, den Durchschnitt des im Patienten vorkommenden Virus zu kennen, da dieser Durchschnitt der Situation im Patientenorganismus am ähnlichsten ist. Diese Virusquasispezies wurde von Viruslasttests nicht erkannt. Ein einziger Klon stellt eine artifizielle Reduktion der vorhandenen Erbinformation dar und würde die häufigsten viralen Mutationen nicht wiedergeben.

## **4.2 Einordnung der Ergebnisse**

### 4.2.1 Resultat der Analyse des Virusgenoms

Aus den Analysen des Virusgenoms mit verschiedenen Computerprogrammen geht hervor, dass das Virus aus Isolat MVP-30846 dem HIV-1-M/F1-Subtypen am ähnlichsten ist. Nähere Analysen zeigen, dass es einem bekannten F1-Subtypen besonders ähnelt, nämlich dem Subtyp F1.BE.93.VI850. In weiteren, kleineren Abschnitten gleicht das Virus auch dem F2-Subtypen. Es besitzt aber, wie für alle HIVs typisch, insbesondere im env-Bereich ein individuelles Genom. Durch env werden Hüllproteine kodiert, die aufgrund des auf ihnen lastenden Selektionsdrucks sehr heterogen sind.

### 4.2.2 Deletion im gag-Protein p6 und in GagPol TransFrame/p6\*

Bei der Durchsicht des sequenzierten Genoms von MVP-30846 war eine Deletion von 18 Basen beziehungsweise 6 Aminosäuren aufgefallen. Diese Deletion betrifft sowohl das Link-Protein p6 aus gag als auch GagPolTF/p6\* aus pol, das den Übergang zur Protease bildet, da gag und pol sich an dieser Stelle im Genom überschneiden.

#### 4.2.2.1 Deletion im gag-Protein p6

Das Protein p6 ist, in Verbindung mit den Zellproteinen Tsg 101 und Ubiquitin, am Prozess des „buddings“, dem Abschnüren des reifenden Virions von der befallenen Zelle, beteiligt (Mazzé & Degrève, 2006). Außerdem wird p6 für die Inkorporierung von vpr in das Viruspartikel benötigt (Kondo, Mammano et al., 1995). Die zwei funktionsrelevanten Motive in p6, PTAP und LXSLFG, sind bei MVP-30846 vollständig vorhanden. An allen anderen Positionen wird p6 generell als sehr

heterogen beschrieben (Peters, Munoz et al., 2001). Die bei Peters et al. beschriebenen Polymorphismen zwischen PTAP und LXSLFG sind Insertionen von 9 und Deletionen von 8 Aminosäuren, die bei Patienten mit Resistenzen gegen NRTI gefunden wurden.

In den Versuchen von Pikora et al. konnte nachgewiesen werden, dass 2-Aminosäuren-Deletionen, die sich zwischen den beiden funktionsrelevanten Motiven befinden, die Infektivität des Virions nicht vermindern. Die Deletion sollte also keine schwerwiegenden Konsequenzen für die Funktionalität von p6 haben (Pikora, Wittish et al., 2006). Mit größeren Deletionen wurde allerdings nicht gearbeitet. Ebenso wurden Deletionen an der Position der Deletion in MVP-30846 nicht überprüft.

Dort befindet sich das konservierte Motiv KQE, an das Ubiquitin oder SUMO-1 (Small ubiquitin-like modifier 1) binden (Fossen, Wray et al., 2005).

Eine Bindung von Ubiquitin an dieser Stelle in p6 verstärkt normalerweise die Interaktion von p6 mit Tsg101, ist aber zur Virusvermehrung nicht notwendig, da Mutationen an der Bindungsstelle, die keine Bindung von Ubiquitin mehr ermöglichen, zu keiner Verminderung der Replikation führen.

Die Funktion von SUMO-1 in der HIV-Replikation ist noch nicht vollständig geklärt. Es scheint aber eine Reduktion der Infektiosität von HIV auszulösen. Da SUMO-1 aber außer an p6 noch an viele zelleigene Proteine wie RanGAP oder Transkriptionsfaktoren bindet, muss diese Reduktion der Infektiosität nicht zwingend durch die Bindung an p6 zustande kommen. Insgesamt ist SUMO-1 an nur 2 Prozent von allen in einem Virion vorhandenen p6-Proteinen gebunden (Gurer, Berthoux et al., 2005).

#### 4.2.2.2 Deletion in GagPol TransFrame/p6\*

Die Aufgabe des GagPol TransFrame-Proteins, das im gagpol-Vorläuferprotein den Anfang von pol bis zum Beginn der Protease bildet, besteht in einer Regulierung der Protease während der Virusreplikation. Sie wird aber immer noch kontrovers diskutiert.

Die bestehende Deletion in MVP-30846 befindet sich in der Nähe des 3'-Endes von GagPol TransFrame. Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle hat keinen Einfluss auf die Infektiosität des Virus (Paulus, Ludwig et al., 2004). Aminosäuremutationen ab Position 21 scheinen keinerlei Einfluss auf ein korrektes Prozessieren der Protease zu haben. Leider wurden Deletionen in dem hier beobachteten Bereich

bisher nicht getestet. Insgesamt besteht zwischen den verschiedenen bekannten GagPol TransFrame-Genomen aber nur eine Homologie von ca. 40 %.

Chiu et al. demonstrieren sogar, dass ein komplettes Fehlen von GagPol TransFrame nur eine Reduktion der Infektiosität zur Folge hat (Chiu, Wang et al., 2006). Daher ist davon auszugehen, dass die Deletion in MVP-30846 keine große Veränderung in der Infektiosität des Virusstamms hervorruft.

#### 4.2.3 Grund für das Scheitern der Viruslastmessung durch COBAS® Amplicor® und COBAS® TaqMan®

Sowohl der COBAS® TaqMan®-Viruslasttest als auch COBAS® Amplicor® von Roche Diagnostics GmbH konnten Isolat MVP-30846 nicht nachweisen.

Dies erklärt sich bei COBAS® Amplicor® durch die von Drexler et al. beschriebenen Mutationen, die sich identisch an der Position von Detektionssonde und Antisense Primer im Genom von Isolat MVP-30846 finden: Die beiden Cytosine an den Positionen 3 und 33 in der Detektionssonde und das Cytosin an Position 3 sowie die beiden Thymine an den Positionen 9 und 15 im Antisense Primer sind anscheinend für das Scheitern des Virusnachweises ausreichend.

Beim COBAS® TaqMan® Viruslasttest lässt sich eine etwas eingeschränkte Aussage treffen, da nur das Amplicon bekannt ist, nicht aber die genaue Länge und Lage der Detektionssonde sowie der Primer. Wären die Primer unter 22 Basen lang, gäbe es keine Mutation im Sense Primer, aber drei Mutation im Antisense Primer: Thymin statt Cytosin an Position 1500, Adenin statt Thymin an Position 1506 und Guanin statt Cytosin an Position 1514. Diese Mutationen sind für das Scheitern des Nachweises eine ausreichende Erklärung.

Wären die Primer aber 22mer, hätten sie beide an Position 1 (Position, an der die erste Anlagerung des Primers an die DNA erfolgt, also Position 1380 des Sense Primer und Position 1494 des Antisense Primer) Thymin statt Cytosin. Diese Mutationen würden ein komplettes Ausfallen des Tests bewirken, da keine Anlagerung der Primer an die DNA mehr erfolgen könnte und somit keinerlei Nachweis von DNA mehr möglich wäre.

Beim Vergleich der Position der Primer von COBAS® Amplicor® und des Amplicons von COBAS® TaqMan® fällt auf, dass diese an der gleichen Stelle im Virusgenom liegen, an Position 1359-1595 nach HXB2. Das 5'-Ende des COBAS® Amplicor®-



Amplicons endet an der gleichen Position wie das 5'-Ende des COBAS® TaqMan®-Amplicons, am 3'-Ende ist das COBAS® TaqMan®-Amplicon 2 Nukleinsäuren länger. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass die Primer sowie die Detektionssonde von COBAS® TaqMan® an derselben Position wie die bereits veröffentlichten Primer des COBAS® Amplicor® liegen. Wäre dies der Fall, wären Primer und Sonde jeweils ca. 30 Basen lang. Im Sense Primer würden keine Mutationen durch die Verlängerung hinzukommen. In der Detektionssonde würden sich 3 Mutationen befinden: Cytosin statt Guanin an Position 1398, Thymin statt Cytosin an Position 1401 und Adenin statt Guanin an Position 1410. Im Antisense Primer würde eine Mutation hinzukommen: Cytosin statt Adenin an Position 1488. Das ist Position 3 nach der Position, an der die erste Anlagerung des Primers an die DNA erfolgt, und somit ebenso eine ausreichende Erklärung für das Scheitern der Viruslastmessung durch den COBAS® TaqMan®.

Korn et al. vergleichen in ihrer Veröffentlichung den Sequenzabschnitt von Isolat MVP-30846 auf der Höhe des Amplicons von COBAS® TaqMan® mit 4 weiteren Sequenzen, die ebenfalls durch diesen Viruslasttest unterquantifiziert oder nicht detektiert werden, durch den COBAS® Amplicor® und den Abbott® m2000rt® aber in ähnlicher Größenordnung quantifiziert werden (Korn, Weissbrich et al., 2009). Diese insgesamt 5 Sequenzen weisen als einzige gemeinsame Mutation Cytosin statt Adenin an Position 1488 im Antisense Primer auf. Dies ist also wahrscheinlich die Mutation, die das Scheitern der Viruslastmessung durch COBAS® TaqMan® auslöst.

Allerdings stellt sich die Frage, warum COBAS® Amplicor® 4 dieser 5 Virusstränge quantifizieren kann und COBAS® TaqMan® diese Aufgabe nicht erfüllt, da beide Tests in derselben Region im gag-Bereich arbeiten.

Möglicherweise sind Unterschiede in der Funktionsweise dieser Tests verantwortlich. COBAS® Amplicor® arbeitet auf der Basis einer Reverse Transkriptase-PCR. COBAS® TaqMan® verwendet eine neuere Technik namens Real-Time-PCR, die eine genauere Bestimmung der zu Beginn der Messung hinzugefügten RNA-Menge erlaubt. Es ist also wahrscheinlich, dass Veränderungen der PCR-Konditionen zu einer höheren Empfindlichkeit von COBAS® TaqMan® gegenüber Mutationen führen.

Außerdem weisen Wittek et al. in ihrer Veröffentlichung darauf hin, dass im Vergleich zu anderen Viruslasttests die Detektionssonden des COBAS® TaqMan® sehr

spezifisch sind und keine Virusmutationen an ihrer Bindungsstelle bei der Hybridisierung zulassen (Wittek, Stürmer et al., 2007). Der Grund für dieses Verhalten ist das Testsystem, welches auf dem Aussenden eines Fluoreszenzsignals basiert. Dieses Fluoreszenzsignal ist in höchstem Maße abhängig von einer perfekten Hybridisierung zwischen Sonde und Virusgenom. Daher warnen Wittek et al. vor einer schlechteren Viruserkennung durch den COBAS® TaqMan® vor allem bei einem so heterogenen Virus wie HIV. Solange die genaue Position der Detektionssonde des COBAS® TaqMan® nicht bekannt ist, kann dies als Ursache für das Scheitern der Viruslastmessung nicht ausgeschlossen werden.

Isolat MVP-30846 hat von allen durch Korn et al. veröffentlichten Sequenzen die höchste Anzahl von Mutationen, insgesamt 16, im Bereich des COBAS® TaqMan®-Amplicons. Eine oder mehrere dieser Mutationen scheinen, im Unterschied zu den anderen Sequenzen, COBAS® Amplicor® ebenfalls zum Scheitern zu bringen. Mutmaßlich verhindern die 5 aufgezählten Mutationen im Bereich des Bindungsortes des Antisense Primer eine Anlagerung. Diese sind bei den 4 anderen Virusgenomen nicht nachweisbar.

Eine Untersuchung von insgesamt 1206 HIV-1/M-Sequenzen der HIV-Datenbank des Los Alamos National Laboratory zeigt, dass ca. 2% der Sequenzen die beschriebene Mutation an Position 1488 tragen und somit wahrscheinlich durch den COBAS® TaqMan® unterquantifiziert oder nicht detektiert werden könnten.

### **4.3 Bedeutung der Viruslastmessung im klinischen Alltag**

#### **4.3.1 Voraussage von Krankheitsverlauf und Infektiosität, Therapieentscheidung**

In der klinischen Praxis werden bei asymptomatischen HIV-Patienten alle drei Monate die Viruslast und die CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl bestimmt, um ein Voranschreiten der Erkrankung vor dem Auftreten von Symptomen erkennen zu können.

Dieses Vorgehen beruht auf Erkenntnissen aus Studien zu prognostischen Faktoren, die eine Progression von HIV anzeigen können, wie von Mellors et al. In dieser prospektiven, multizentrischen Studie wurde bei 1604 HIV-infizierten Männern verschiedene klinische und serologische Parameter analysiert und auf ihre Voraussagekraft von AIDS und dem Tod hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass die

Viruslastmessung die beste Voraussagekraft hat, gefolgt von der CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl (Mellors, Munoz et al., 1997).

In einem starken Ansteigen der Viruslast sowie fallender CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl, vor allem unter 350 Zellen/ $\mu$ l, sehen die aktuellen Leitlinien eine Indikation zum Start der antiretroviralen Therapie (Quelle: [www.europeanaidscinicalsociety.org](http://www.europeanaidscinicalsociety.org), Treatment Guidelines). Bei unkorrekter Viruslastmessung könnte der optimale Zeitpunkt zum Einstieg in die Therapie verpasst werden. Das Risiko der Entwicklung von AIDS und AIDS-assoziierten Erkrankungen wie Pneumozystis-jirovecii-Pneumonie würde ansteigen und damit das Leben der Patienten gefährden.

Der Therapieerfolg wird am Abfallen der Viruslast unter die Nachweisgrenze des angewandten Viruslasttests und an einem Ansteigen der CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl gemessen. Da die Viruslast meist schneller abfällt als dass sich die CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl erholt, fehlt bei einer falsch bestimmten Viruslast ein wichtiger Faktor zur schnellen Visualisierung des Therapieerfolgs.

Aus diesen Gründen ist die Bestimmung der Viruslast sowohl als prognostischer Faktor als auch als Parameter für Therapieentscheidung und Therapieerfolg von großer Wichtigkeit.

Außerdem hat die Viruslast bei der Beurteilung der Infektiosität von Patienten Bedeutung. Die Eidgenössische Kommission für AIDS-Fragen EKAF empfiehlt in einer Veröffentlichung, dass serodifferente Paare ungeschützten Sex haben können, wenn der seropositive Partner unter antiretroviraler Therapie seit sechs Monaten eine Viruslast unter der Nachweisgrenze hat und keine anderen Geschlechtskrankheiten vorliegen. Eine Unterquantifizierung der Viruslast, die bei geschätzten 2% der Infektionen geschehen kann, könnte eine Fehleinschätzung der Infektiosität und somit eine Infektion des seronegativen Partners zur Folge haben. Bei Paaren mit Kinderwunsch, die aus diesem Grund beim Sex auf das Kondom verzichten wollen, wäre auch das ungeborene Kind der Gefahr ausgesetzt, infiziert zu werden (Quelle: <http://www.bag.admin.ch/>).

#### 4.3.2 Einsatz der Viruslastmessung als Screeningtest für Blutspenden

Die Viruslastmessung wird routinemäßig als Screeningtest für Blutspenden verwendet, um Viruspartikel bei noch nicht serokonvertierten und p24-Antigen-negativen Patienten nachweisen zu können (Wiedmann, Kluwick et al., 2007). Dazu werden sogenannte Pools hergestellt (eine getestete Pool-Probe enthält Blut aus verschiedenen Blutspenden) und getestet. Durch den Einsatz dieser Methode wird die HIV-Testung günstiger. Ist eine Pool-Probe positiv, werden alle Blutkonserven, die in diesem Pool getestet wurden, einzeln nachgetestet, um die positive Konserve zu ermitteln.

Diese Viruslastmessung ist die einzige Möglichkeit, die Transmission von HIV durch Blutspenden von noch nicht serokonvertierten und p24-Antigen-negativen Patienten zu verhindern (Gürtler, Eberle et al., 1994).

Wenn diese Messung nicht alle Viren erkennt, da Primer und Diagnostiksonde einen Teil der Infektionen nicht erfassen können, werden Bluttransfusionen weiterhin ein Risiko für eine HIV-Infektion sein. Aus diesem Grund sollte jedem Hinweis auf eine diagnostische Lücke in Viruslasttests nachgegangen werden, sowohl von Laboratorien als auch von den Herstellerfirmen.

Eine erste HIV-Infektion über eine Bluttransfusion, in der das Virus aufgrund von Mutationen in der Region, in der Primer und Detektionssonde binden, durch den COBAS® TaqMan® nicht detektiert werden konnte, beschreiben Schmidt et al. (Schmidt, Korn et al., 2009)

#### **4.4 Ausblick und Verweis auf andere Beobachtungen**

##### 4.4.1 Generelles Problem von Viruslasttests bei der Detektion von HIV-1-Subtypen

In mehreren Veröffentlichungen wurde über die generelle Schwierigkeit der Detektion von HIV-1 Subtypen geschrieben. COBAS® Amplicor®, COBAS® TaqMan® und bioMerieux® NucliSens® Viruslasttests detektieren diese Viren nicht zuverlässig. Mercado et al. beschreiben eine Unterquantifizierung von Subtyp-F-Viren in Brasilien durch COBAS® Amplicor® (Mercado, Di Dio et al., 1999). Bei ihrer Untersuchung eines Patientenkollektivs in Sao Paulo waren 18% der Proben durchschnittlich 1,08 log HIV-RNA-Kopien/ml unterquantifiziert. Bei der Sequenzierung der gag-Abschnitte

dieser HIV-Proben zeigte sich, dass alle unterquantifizierten Proben Subtyp-F-Viren enthielten.

In einer weiteren Veröffentlichung verglichen Gueudin et al. die Viruslastmessung durch COBAS® TaqMan® und Abbott® m2000rt® anhand von Plasmaproben und Kulturüberständen aus den HIV-1-Gruppen M und O (Gueudin, Plantier et al., 2007). 4 von 88 Plasmaproben wurden dabei durch den COBAS® TaqMan® um mehr als eine Logstufe unterquantifiziert. Diese Plasmaproben enthielten die Virussubtypen CRF-02, A, G und H.

Eine französische Gruppe unter der Leitung von Colson hat ein Ehepaar mit unterquantifizierten Viren beobachtet, das durch niedrige CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahlen (112/mm<sup>3</sup> bzw. 90/mm<sup>3</sup>) bei vergleichsweise niedriger Viruslast (973 Kopien/ml bzw. 263 Kopien/ml), gemessen mit COBAS® TaqMan®, aufgefallen war. Der Virussubtyp CRF02\_AG wurde bei beiden Patienten identifiziert. Die Arbeitsgruppe schlägt eine Viruslastmessung mit zwei verschiedenen Tests bei seropositiven, unbehandelten Patienten, deren Viruslast permanent unter der Nachweisgrenze oder sehr niedrig ist, vor, insbesondere wenn niedrige CD4<sup>+</sup>T-Lymphozytenzellzahlen auffallen. Damit könnte eine größere Sicherheit erlangt werden, solange kein Test eine hundertprozentig sichere Viruslastmessung bieten kann (Colson, Solas et al., 2007).

Drexler et al. berichten von einer Unterquantifizierung durch COBAS® Amplicor® und bioMerieux® NucliSens® (Drexler, de Souza Luna et al., 2007). Sie untersuchten 1195 HIV-Proben aus verschiedenen brasilianischen Regionen mit diesen Viruslasttests. Dabei wurden 0,47% der Proben von COBAS® Amplicor®, aber 4,33% der Proben durch bioMerieux® NucliSens® unterquantifiziert. Die durch COBAS® Amplicor® unterquantifizierten Proben enthielten Subtyp-F-Viren, die durch bioMerieux® NucliSens® unterquantifizierten Proben Subtyp-B-Viren und BF-Rekombinanten. Da diese Virussubtypen vor allem in Nordbrasilien mit ca. 50% am häufigsten vorkommen, empfehlen Drexler et al., den bioMerieux® NucliSens® Viruslasttest in Brasilien nicht zu verwenden.

Insgesamt ist eines der Grundprobleme die Amplifikation durch COBAS® Amplicor® und COBAS® TaqMan® im gag-Bereich. Die Mutationsrate in diesem Bereich ist, verglichen mit dem pol-Bereich, höher, da die durch gag kodierten Proteine weniger stark als die durch pol kodierten Proteine konserviert bleiben müssen, um deren Funktion zu garantieren. Daher birgt ein Test, der auf der Basis einer Amplifikation im

pol-Bereich arbeitet, ein geringeres Risiko einer Unterquantifizierung aufgrund von Mutationen. Am besten wäre es jedoch für die Virusquantifizierung parallel mehrere Genbereiche zu nutzen.

#### 4.4.2 Bedeutung der F1-Subtypen weltweit

Generell wäre es für die weltweite HIV-Therapie von großer Bedeutung, dass diese Tests HIV-1-M/F-Subtypen korrekt quantifizieren könnten. Vor allem in Brasilien gehören HIV-1-M/F-Subtypen zu den am meisten verbreiteten Viren (14 % der Infektionen).

Isolat MVP-30846 stammt aus der Republik Kongo, in der F-Subtypen nicht zu den häufigsten Viren zählen: In ihrer Veröffentlichung berichten Niama et al. von einem Überwiegen der Subtypen A, G sowie D (36,5%, 30,8% und 12,5% im gag-Bereich). C, F, H, J, K und die CRFs-01, -02, -05, -06 und -18 sind in niedrigeren Prozentsätzen vorhanden (Niama, Toure-Kane et al., 2006).

Allerdings haben viele Subtyp-F-Sequenzen, die auf der Internetseite [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov) verfügbar sind, ihren Ursprung im Kongo: Meist kann die Infektion bei den veröffentlichten Sequenzen bis auf einen aus dem Kongo stammenden Patienten zurückverfolgt werden. Dies kommt wahrscheinlich durch den Explantationseffekt zustande: Wenn ein HIV-infizierter Patient in einem anderen Land auf ein Kollektiv trifft, in dem HIV noch nicht sehr verbreitet ist, kann sich dieses Virus dort sehr schnell verbreiten und der prädominante Subtyp werden, auch wenn dieser Subtyp in seiner Heimat nicht prädominant ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Viruslastbestimmung mittels PCR ist eine der wichtigsten Methoden in der frühen HIV-Diagnostik und Therapieerfolgsüberwachung.

In der vorliegenden Arbeit wurde dem Grund für das Scheitern der Viruslastmessung bei einem aus der Demokratischen Republik Kongo stammenden Patienten nachgegangen. Viruslastmessungen mit drei verschiedenen Viruslasttests, COBAS® TaqMan® und COBAS® Amplicor® der Firma Roche Diagnostics sowie m2000rt® der Firma Abbott Diagnostics, hatten eine massive Unterquantifizierung der Viruslast durch die Viruslasttests von Roche Diagnostics gezeigt.

Um den Grund für diese Unterquantifizierung festzustellen, wurde das Virus isoliert und das komplette Virusgenom (MVP-30846, HIV Sequence Database Accession Nr. EU 446022) mittels nested PCR vervielfacht und sequenziert.

Das Virusgenom konnte der Gruppe HIV-1-M, Subtyp F1 zugeordnet werden.

In der Sequenz besonders auffällig war eine Deletion von 18 Basen im gag-Protein p6 bzw. im Protein GagPol TransFrame aus dem pol-Protein. Eine genauere Analyse zeigte, dass alle für die Funktionstüchtigkeit relevanten Motive in den beiden Proteinen vorhanden waren, sodass nicht von einer verminderten Infektiosität des Virus ausgegangen werden muss.

Ein Alignment der Virussequenz mit Primern und Detektionssonde des COBAS® Amplicor® zeigte, dass einige Mutationen an den Bindungsstellen der Primer und Detektionssonde im Virusgenom vorliegen, die für das Scheitern der Viruslastmessung verantwortlich sind.

Die exakten Positionen von Primern und Detektionssonde des COBAS® TaqMan® sind nicht bekannt. Es existiert nur ein Amplicon, welches beidseits durch die Primer begrenzt wird und an derselben Stelle liegt wie Primer und Detektionssonde des COBAS® Amplicor®. Es sind also dieselben Mutationen, die beim COBAS® TaqMan® für das Scheitern der Messung mitverantwortlich zu machen sind, wenngleich die genaue Position der Detektionssonde nicht bekannt ist.

In einer Veröffentlichung wurde MVP-30846 mit vier weiteren Sequenzen verglichen, die ebenfalls durch COBAS® TaqMan® unterquantifiziert wurden, durch COBAS® Amplicor® aber quantifiziert werden konnten. Eine Mutation an Position 1488 im Antisense Primer ist die einzige feststellbare Gemeinsamkeit dieser Sequenzen, die aber für das Scheitern des COBAS® Amplicor® bei den vier weiteren Sequenzen nicht auszureichen scheint. Die Unterquantifizierung von MVP-30846 mit COBAS® Amplicor® kann durch eine besonders hohe Anzahl an Mutationen erklärt werden, die bei den anderen untersuchten Viren nicht vorliegen.

Eine mögliche Erklärung für das Scheitern der Viruslastmessung durch COBAS® TaqMan® bei allen fünf untersuchten Sequenzen, abseits der Mutation an Position 1488, ist die Verwendung der moderneren Real-Time-PCR-Technik. Eine Veränderung der PCR-Konditionen im Rahmen der Testumstellung könnte zu einer erniedrigten Sensitivität von COBAS® TaqMan® geführt haben. Außerdem ist die Detektionssonde bei der neuen Testkonfiguration wesentlich spezifischer und lässt keine Virusmutationen an der Hybridisierungsstelle zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben neben anderen Untersuchungen zur Aufklärung des Versagens des COBAS® TaqMan® Viruslasttests geführt und waren Grundlage für eine verbesserte Variante (Version 2) dieses häufig verwendeten Verfahrens.



## 6 Literaturverzeichnis

Alkhatib, G., Combadière, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., Berger, E. A., 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Berger, A., Braner, J., Doerr, H. W., Weber, B., 1998. Quantification of viral load: clinical relevance for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Intervirology* 41, 24-34.

Bonfield, J. K., Smith, K. F., Staden, R. A., 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 24, 4992-4999.

Butler, I. F., Pandrea, I., Marx, P. A., Apetrei, C., 2007. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr.HIV.Res.* 5, 23-45.

Chermann, J. C., Barré-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot.Chemother.* 32, 48-53.

Chiu, H. C., Wang, F. D., Chen, Y. M., Wang, C. T., 2006. Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6\* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J.Gen.Virol.* 87, 2041-2046.

Colson, P., Solas, C., Moreau, J., Motte, A., Henry, M., Tamalet, C., 2007. Impaired quantification of plasma HIV-1 RNA with a commercialized real-time PCR assay in a couple of HIV-1-infected individuals. *J.Clin.Virol.* 39, 226-229.

De Clercq, E., 2007. Anti-HIV drugs. *Verh.K.Acad.Geneeskd.Belg.* 69, 81-104.

Drexler, J. F., de Souza Luna, L. K., Pedroso, C., Pedral-Sampaio, D. B., Queiroz, A. T., Brites, C., Netto, E. M., Drosten, C., 2007. Rates of and reasons for failure of commercial human immunodeficiency virus type 1 viral load assays in Brazil. *J.Clin.Microbiol.* 45, 2061-2063.

Fadel, H., Temesgen, Z., 2007. Maraviroc. *Drugs Today (Barc.)* 43, 749-758.

Felsenstein, J., 1992. Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method. *Genet.Res.* 60, 209-220.

Fossen, T., Wray, V., Bruns, K., Rachmat, J., Henklein, P., Tessmer, U., Maczurek, A., Klinger, P., Schubert, U., 2005. Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J.Biol.Chem.* 280, 42515-42527.

Gallant, J. E., 2005. Antiretroviral drug resistance and resistance testing. *Top.HIV.Med.* 13, 138-142.

- Garcia-Lerma, J. G., Heneine, W., 2002. Rapid biochemical assays for phenotypic drug resistance testing of HIV-1. *J.Antimicrob.Chemother.* 50, 771-774.
- Grinsztejn, B., Nguyen, B. Y., Katlama, C., Gatell, J. M., Lazzarin, A., Vittecoq, D., Gonzalez, C. J., Chen, J., Harvey, C. M., Isaacs, R. D., 2007. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 369, 1261-1269.
- Gueudin, M., Plantier, J. C., Lemée, V., Schmitt, M. P., Chartier, L., Bourlet, T., Ruffault, A., Damond, F., Vray, M., Simon, F., 2007. Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 44, 500-505.
- Gurer, C., Berthoux, L., Luban, J., 2005. Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J.Virol.* 79, 910-917.
- Gürtler, L., 2004. SIV as a source of HIV. On the origin of human immunodeficiency viruses from non-human primates. *Bundesgesundheitsblatt.Gesundheitsforschung.Gesundheitsschutz.* 47, 680-684.
- Gürtler, L., Mühlbacher, A., Michl, U., Hofmann, H., Paggi, G. G., Bossi, V., Thorstensson, R., Villaescusa, R., Eiras, A., Hernandez, J. M., Melchior, W., Donie, F., Weber, B., 1998. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J.Virol.Methods* 75, 27-38.
- Gürtler, L. G., Eberle, J., Bader, L., 1994. Transfusion-associated HIV infection. *Infusionsther.Transfusionsmed.* 21 Suppl 1, 7-10.
- Hoffmann, C., Rockstroh, J., Kamps, B. S., 2007. HIV.net 2007. Steinhäuser Verlag.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., Varmus, H. E., 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331, 280-283.
- Katzenstein, D. A., Hammer, S. M., Hughes, M. D., Gundacker, H., Jackson, J. B., Fiscus, S., Rasheed, S., Elbeik, T., Reichman, R., Japour, A., Merigan, T. C., Hirsch, M. S., 1996. The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Study Team. *N.Engl.J.Med.* 335, 1091-1098.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A., Göttlinger, H. G., 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J.Virol.* 69, 2759-2764.
- Korn, K., Weissbrich, B., Henke-Gendo, C., Heim, A., Jauer, C. M., Taylor, N., Eberle, J., 2009. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the Cobas TaqMan HIV-1 real-time PCR assay. *J.Clin.Microbiol.* 47, 1238-1240.

Kuiken, C., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J. W., Mullins, J., Wolinski, S., Korber, B., 1999. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.

Mazzé, F. M., Degève, L., 2006. The role of viral and cellular proteins in the budding of human immunodeficiency virus. *Acta Virol.* 50, 75-85.

McDougal, J. S., Cort, S. P., Kennedy, M. S., Cabridilla, C. D., Feorino, P. M., Francis, D. P., Hicks, D., Kalyanaraman, V. S., Martin, L. S., 1985. Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV). *J. Immunol. Methods* 76, 171-183.

Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J. V., Margolick, J. B., Tassoni, C. J., Gupta, P., Kingsley, L. A., Todd, J. A., Saah, A. J., Detels, R., Phair, J. P., Rinaldo, C. R., Jr., 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.* 126, 946-954.

Mercado, J. M., Di Dio, R., Pradal, M. G., 1999. Genetic diversity of HIV-1 subtype F from Brazil: failure of HIV-1 viral load testing based on molecular biology amplification methods. *AIDS* 13, 2183-2185.

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., 2002. *Molekulare Virologie*. Spektrum-Akademischer Verlag.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.

Mullis, K. B., Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

Niama, F. R., Toure-Kane, C., Vidal, N., Obengui, P., Bikandou, B., Ndoundou Nkodia, M. Y., Montavon, C., op-Ndiaye, H., Mombouli, J. V., Mokondzimobe, E., Diallo, A. G., Delaporte, E., Parra, H. J., Peeters, M., Mboup, S., 2006. HIV-1 subtypes and recombinants in the Republic of Congo. *Infect. Genet. Evol.* 6, 337-343.

Paulus, C., Ludwig, C., Wagner, R., 2004. Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6\* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 330, 271-283.

Peters, S., Munoz, M., Yerly, S., Sanchez-Merino, V., Lopez-Galindez, C., Perrin, L., Larder, B., Cmarko, D., Fakan, S., Meylan, P., Telenti, A., 2001. Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J. Virol.* 75, 9644-9653.

Pikora, C. A., Wittish, C., Desrosiers, R. C., 2006. p6gag of human and simian immunodeficiency viruses is tolerant to small in-frame deletions downstream of the late domain. *Virology* 346, 479-489.

Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L. L., Mitsuya, H., Liou, R. S., Gallo, R. C., Wong-Staal, F., 1987. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3, 57-69.

Rozen, S., Skaletsky, H. J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4, 406-425.

Sanger, F., 1981b. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214, 1205-1210.

Sanger, F., 1981a. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci.Rep.* 1, 3-18.

Sattentau, Q. J., Weiss, R. A., 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52, 631-633.

Schmidt, M., Korn, K., Nubling, C. M., Chudy, M., Kress, J., Horst, H. A., Geusendam, G., Hennig, H., Sireis, W., Rabenau, H. F., Doerr, H. W., Berger, A., Hourfar, M. K., Gubbe, K., Karl, A., Fickenscher, H., Tischer, B. K., Babel, R., Seifried, E., Gurtler, L., 2009. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion*.

Stieger, M., Démollière, C., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., 1991. Competitive polymerase chain reaction assay for quantitation of HIV-1 DNA and RNA. *J.Virol.Methods* 34, 149-160.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol.Biol.Evol.* 24, 1596-1599.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 11030-11035.

Tan, J. X., Kang, X. J., Zhang, W., Liu, P. P., Tong, X., Yang, R. G., 2007. Full-length clone and characterization of a human immunodeficiency virus type 1 subtype B' isolated from Hubei Province, China. *Chin Med.J.(Engl.)* 120, 831-833.

Wiedmann, M., Kluwick, S., Walter, M., Fauchald, G., Howe, J., Bronold, M., Zauke, M., 2007. HIV-1, HCV and HBV seronegative window reduction by the new Roche cobas TaqScreen MPX test in seroconverting donors. *J.Clin.Virol.* 39, 282-287.

Wittek, M., Stürmer, M., Doerr, H. W., Berger, A., 2007. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 7, 237-246.

## **7 Danksagung**

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. Josef Eberle, der mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Sowohl seine exzellente fachliche Betreuung als auch seine weiterführenden Ideen haben mir sehr geholfen.

Ebenfalls möchte ich mich für Hilfe, Geduld und Ratschläge bei Dr. med. Lars Dölken, Dr. med. Martin Obermaier, Dr. med. Hans Nitschko, Frau Hiroko Matsuba und Frau Helga Mairhofer bedanken.

Außerdem gilt Frau Ass. Dr. Ninon Taylor von der Universitätsklinik Salzburg mein Dank. Ohne ihr Gespür für die klinische Beurteilung von HIV-Patienten hätte es mein Dissertationsthema nicht gegeben.

Schließlich danke ich meinen Eltern Christa Moerstedt-Jauer und Joachim Jauer und meinem Freund Nicolas Graf für Ihre liebevolle Unterstützung.