

**Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Leiter:

Professor Dr. med. Thomas Löscher

**HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) Typ 1:
Subtypenverteilung, Mehrfachinfektionen und
Charakterisierung der Viruspopulationen in einer
Hochrisikokohorte in Tansania**

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

Vorgelegt von Martina Gerhardt
aus Berlin

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle

Prof. Dr. Frank- Detlef Goebel

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Michael Hölscher

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Publizierte, eingereichte und sich in Vorbereitung befindliche Veröffentlichungen:

Gerhardt M, Mloka D, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Hoffmann O, Maboko L, Mmbando D, Birx DL, McCutchan FE and Hoelscher M. 2005. *In-Depth, Longitudinal Analysis of Viral Quasispecies from an Individual Triply Infected with late-stage Human Immunodeficiency Virus Type 1, Using a Multiple PCR Primer. J Virol* **79(13):8249-8261**

Herbinger K-H, **Gerhardt M**, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo M, Hoffmann O, Maboko L, Birx DL, Mmbando D, McCutchan FE and Hoelscher M. *Frequency of HIV-1 multiple infection and HIV diversity: analysis of low and high risk populations in Mbeya region, Tanzania. AIDS Res Hum Retroviruses, eingereicht*

Geldmacher Ch, **Gerhardt M**, Currier J, Morafu V, Kuta E, Haule A, Hoffmann O, Maboko L, Birx DL, Gray C, Meyerhans A, McCutchan FE, Cox J and Hoelscher M. *Analysis and comparison of the HIV-specific T cell response in Dual and Single infected individuals in Mbeya Region, Tanzania. in Vorbereitung*

Piyasirisilp S, **Gerhardt M**, Mloka D, Hoffmann O, Sanders-Buell E, Wilson GM, Tovanabutra S, Robb M, Birx DL, Hoelscher M, Mmbando D, Maboko L and McCutchan FE. *HIV-1 Dual Infection Generated Complex Population Heterogeneity in a High-Risk Cohort in Tanzania. in Vorbereitung*

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	8
1.1	Die Entdeckung des HIV als Ursache von AIDS	8
1.2	Stuktur des HIV	9
1.3	Der retrovirale Replikationszyklus	13
1.4	Klassifizierung des HIV	14
1.5	Das <i>Simian Immunodeficiency Virus</i> (SIV)	15
1.6	Die Abstammung des HIV von SIV	15
1.7	Der Ursprung der AIDS-Pandemie	16
1.8	Genetische Variabilität von HIV.....	18
1.8.1	HIV-1 und HIV-2.....	18
1.8.2	Die verschiedenen Gruppen von HIV-1 und HIV-2	18
1.8.3	Die Subtypeneinteilung der HIV-1 Gruppe M.....	19
1.8.4	Rekombinante Formen (Mosaik-Genome) in der HIV-1 Gruppe M.....	20
1.9	Epidemiologie der HIV-Infektion	22
1.9.1	Ausbreitung der Epidemie	22
1.9.2	Weltweite Verbreitung und Prävalenz von HIV-1.....	23
1.9.3	Verbreitung und Prävalenz von HIV-2	23
1.9.4	Weltweite HIV-1 Subtypenverteilung	24
1.9.5	Verbreitung und Prävalenz von HIV-1 in Afrika	25
1.9.6	Verbreitung und Prävalenz von HIV-1 in Tansania	27
1.10	Molekulare Evolution von HIV-1	27
1.10.1	Mutationen	28
1.10.2	Rekombinationen	29
1.10.3	HIV-1 Mehrfachinfektionen	31
1.11	Strategien zur Impfstoffentwicklung	32
1.11.1	Biologische Eigenschaften von HIV und Probleme bei der Entwicklung eines Impfstoffs.....	32
1.11.2	Bisherige Impfstoffansätze	33
2	Problemstellung und Zielsetzung	36
3	Material und Methoden.....	38

3.1	Das <i>Mbeya Medical Research Programme (MMRP)</i>	38
3.2	Die <i>HIV Superinfection Study (HISIS)</i>	38
3.3	Serologische HIV-Antikörper Tests und Gewinnung der PBMCs.....	39
3.3.1	Gewinnung der Blutproben	39
3.3.2	Serologische HIV-spezifische Antikörper Tests	39
3.3.3	PBMCs: Isolation und Kryopreservation	41
3.4	<i>Multiregion – Hybridisation – Assay (MHA)</i>	42
3.4.1	Prinzip der <i>real-time</i> PCR	42
3.4.2	Prinzip des MHA.....	43
3.4.3	DNA-Extraktion	45
3.4.4	Überführung der DNA in ein <i>96-well-plate</i> Format.....	46
3.4.5	Primer und Taqman®-Sonden.....	46
3.4.6	Erste PCR Runde (konventionelle PCR).....	48
3.4.7	Zweite PCR Runde (<i>real-time</i> PCR).....	48
3.4.8	Auswertung	49
3.4.9	Agarosegelelektrophorese	50
3.5	Longitudinale Analyse der viralen <i>quasispecies</i> einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion	51
3.5.1	Bestätigung der Herkunft aller fünf longitudinalen Proben von der selben Person.....	51
3.5.2	PCR-Amplifikation mit multiplen Primern.....	52
3.5.3	Klonierung.....	54
3.5.4	Selektion rekombinanter Klone und Übernachtskultur.....	55
3.5.5	Plasmidextraktion und Enzymverdau.....	55
3.5.6	Sequenzierung	56
3.5.7	Sequenzanalyse	58
3.6	Evaluierung der PCR-Strategie mit multiplen Primern.....	59
3.7	Sequenzeinträge in <i>Genbank</i>	60
3.8	Material.....	60
3.8.1	Chemikalien.....	60
3.8.2	Enzyme	61
3.8.3	Geräte	61
3.8.4	Kommerzielle Kits	62
3.8.5	Sonstiges.....	63

4	Ergebnisse	64
4.1	Anwendung des MHA zu Subtypenuntersuchungen in einer Hochrisiko- Population (HISIS Studie)	64
4.1.1	MHA Performance innerhalb der HISIS Studie	65
4.1.2	HIV-1 Subtypenverteilung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie (<i>Follow Up 0</i>).....	66
4.1.3	Subtypenmuster der einzelnen Rekombinanten.....	68
4.1.4	Nähere Betrachtung der Mehrfachinfektionen.....	69
4.1.5	Longitudinale Untersuchung der Hochrisikokohorte.....	70
4.2	Longitudinale Analyse der viralen <i>quasispecies</i> einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion	71
4.2.1	PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung in drei Genomregionen.....	71
4.2.2	Phylogenetische Analyse der Sequenzen.....	72
4.2.3	Evaluierung des PCR-Ansatzes mit multiplen Primern.....	90
5	Diskussion	92
5.1	Methodische Aspekte.....	92
5.1.1	Der <i>Multiregion Hybridisation Assay</i> (MHA)	92
5.1.2	PCR-Amplifikation mit multiplen Primerpaaren.....	94
5.2	Prävalenz und Auswertung der HIV-1 Subtypenbestimmung mittels MHA _{ACD}	97
5.2.1	HIV-1 Subtypenverteilung zum Zeitpunkt F0 bei Eintritt in die Studie.....	97
5.2.2	Longitudinale Auswertung der MHA _{ACD} -Ergebnisse.....	100
5.3	Auswertung der Detailanalyse einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion.....	101
5.4	Schlußfolgerungen	103
6	Zusammenfassung	105
7	Literaturverzeichnis	108
8	Danksagung	129
9	Lebenslauf	130

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung des HIV als Ursache von AIDS

Im Jahre 1981 verzeichneten die amerikanischen Gesundheitsbehörden bei jungen, homosexuellen und vorher gesunden Männern eine auffällige Häufung von opportunistischen Infektionen, wie *Pneumocystis carinii* Pneumonien, Candidiasis oder Kaposi-Sarkome (1), welche bis dato nur bei immunsupprimierten Patienten beobachtet wurden. Anfangs ging man davon aus, dass das mit einer stark verminderten T-Zell-Anzahl im Blut einher gehende Krankheitsbild die Folge einer Schwächung des Immunsystems durch Geschlechtskrankheiten oder durch den ständigen Kontakt mit körperfremder Spermienflüssigkeit war (73) und bezeichnete es als GRID (*Gay Related Immune Deficiency*).

Nachdem sich aber die Symptome auch bei Drogenabhängigen, Hämophilen, heterosexuellen Frauen und Männern und sogar Kindern zeigten, führte man den Namen AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) ein, und es mehrten sich die Anzeichen dafür, dass ein durch Blut übertragbares infektiöses Agens der Auslöser der Erkrankung sein könnte.

Schon mehr als 1000 AIDS-Fälle mit einer Mortalität von 40% waren in Amerika registriert (78), als es 1983 der Gruppe um Luc Montagnier am Pariser Pasteur Institut gelang, aus dem Lymphknoten eines AIDS-Patienten ein Retrovirus zu isolieren, welches er LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) nannte (8). Wenig später entdeckten Robert Gallo und sein Team am *National Health Cancer Institute* in Bethesda ebenfalls in den Lymphozyten von Erkrankten ein Retrovirus, welches sie der kurz zuvor beschriebenen Gruppe der Humanen T-Zell-Leukämie-Viren zuordneten, und bezeichneten es als HTLV-3 (*Human T cell Leukemia Virus type 3*) (45, 46). Wie 1986 offiziell bestätigt wurde, waren beide Viren identisch und man einigte sich auf die neue Bezeichnung HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Im gleichen Jahr wurde ein weiteres HI-Virus aus westafrikanischen AIDS-Patienten isoliert und erhielt den Namen HIV-2 (33), während das zuerst entdeckte Virus konkreter als HIV-1 bezeichnet wurde.

1.2 Struktur des HIV

Die ca. 100nm großen HIV-Partikel besitzen wie alle Lentiviren ein konisches Capsid, welches zwei identische, nicht miteinander verbundene RNA-Stränge enthält (Bild 1).

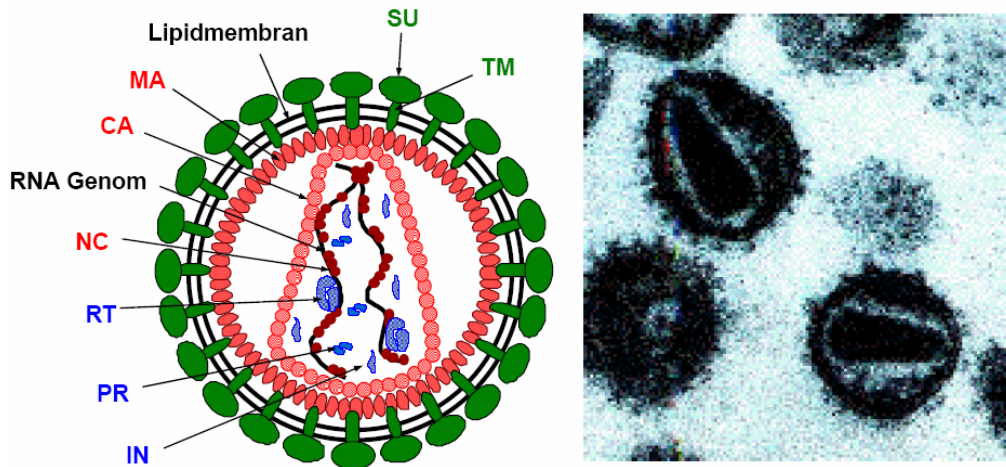
Das HIV-Genom besteht aus ca. 9 – 10 kBp und codiert in neun offenen Leserahmen, sogenannten ORFs (*Open Reading Frames*) für insgesamt 15 Proteine. Drei offene Leserahmen tragen die genetische Information für die typischen retroviralen Polyproteine GAG (*group specific antigen*), POL (*polymerase*) und ENV (*envelope*). Durch Proteasen werden diese Vorläuferproteine (*precursor*) in die sogenannten Strukturproteine zerlegt. Die Zahlen in den Proteinnamen geben das Molekulargewicht in kDa (Kilodalton) an.

GAG: Aus dem GAG-Vorläuferprotein PR55 entstehen durch proteolytische Spaltung die vier Proteine P17, P24, P7 und P6, welche durch ihre Funktionen zur Infektiösität der Viren beitragen.

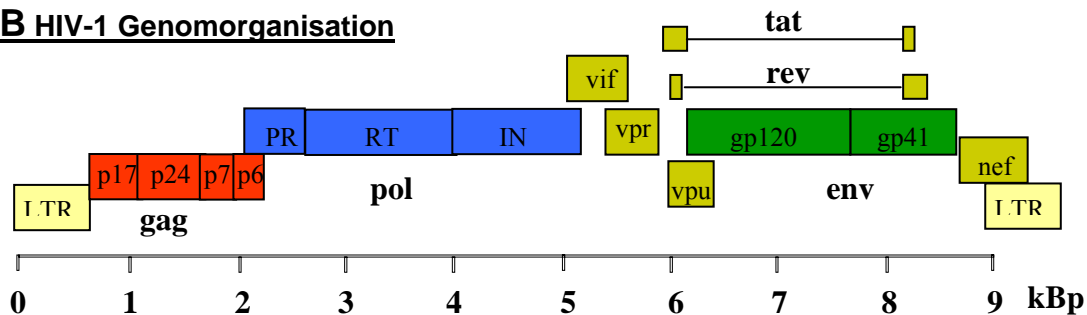
P17, das myristylierte und phosphorylierte Matrix-Protein (MA), ist mit der Innenseite der Hüllmembran assoziiert. Es fördert den Transport des in doppelsträngige DNA überschriebenen Virusgenoms in den Zellkern. Außerdem ermöglicht es die Infektion ruhender Zellen, eine Eigenschaft, welche das HIV von den anderen Retroviren unterscheidet. P24, das Capsid-Protein (CA), stellt eine der identischen Untereinheiten dar, aus denen das konische Capsid aufgebaut ist. Es umhüllt die beiden RNA-Stränge und die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. P7, das Nucleocapsid-Protein (NC), liegt gebunden an die RNA-Genome vor und interagiert mit diesen (Zinkfingermotiv). Das Link-Protein P6 stellt die Verbindung zwischen Capsid und Membran her.

Die GAG-Proteine induzieren spezifische humorale und zelluläre Immunantworten. Die Antikörperspezifität ist wegen des relativ hohen Gehaltes an konservierten Aminosäuren häufig subtypübergreifend. Matrix - und Capsid-Proteine bieten Epitope für die cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), welche – so vermutet man – für die immunologische Kontrolle der Infektion und somit für die Dauer der asymptomatischen HIV-Infektion bis zum Ausbruch von AIDS entscheidend sind.

A Schematischer Aufbau eines HIV-1 Partikels



B HIV-1 Genomorganisation



gag = group specific antigen

- p17 = Matrix-Protein (MA)
- p24 = Capsid-Protein (CA)
- p7 = Nucleocapsid-Protein (NC)
- p6 = Link-Protein

pol = polymerase

- PR = Protease
- RT = Reverse Transkriptase
- IN = Integrase

env = envelope

- SU = surface-Protein (gp120)
- TM = transmembrane-Protein (gp41)

Bild 1. A) Aufbau eines HIV-1 Partikels. Umgeben von einer Hülle aus einer Lipiddoppelschicht, den darin enthaltenen externen und transmembranen Glykoproteinen GP120 (SU) und GP41(TM) und den an der Innenseite verankerten Matrix-Proteinen (MA) findet sich das konische Capsid. Dieses ist aus identischen Untereinheiten des Capsid-Proteins (CA) aufgebaut und umhüllt zwei identische RNA-Genome, komplexiert von Nucleocapsid-Proteinen (NC), und die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase. Im Elektronenmikroskop sind die wesentlichen Bestandteile, wie das konische Capsid und die durch das Glykoprotein GP120 gebildeten *spikes*, deutlich zu erkennen. B) Genomaufbau von HIV-1. Die Exons der regulatorischen Proteine sind durch Querstriche miteinander verbunden.

POL: Aus dem GAG/POL-Vorläuferprotein PR160 werden hydrolytisch die Proteine P9, P51, P66 und P38 freigesetzt.

Die Protease (PR) P9 spaltet die GAG- und GAG/POL-Vorläuferproteine in ihre Einzelkomponenten. P51 und P66 bilden zusammen die Reverse Transkriptase (RT), ein Heterodimer, welches wie das Nucleocapsidprotein P7 an die beiden RNA-Stränge gebunden ist. Das Enzym, welches sowohl die Funktion einer RNA- oder DNA abhängigen Polymerase als auch einer RNase H annehmen kann, katalysiert die (Retro)Transkription der viralen RNA in DNA. Die Integrase (IN) P38 wirkt sowohl als Endonuklease als auch als Ligase. Sie bindet an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA übersetzten Virusgenoms und ist für seine Integration in die Wirts-DNA verantwortlich.

ENV: Der *env*-Leserahmen codiert das glykosylierte Vorläuferprotein GP160, welches durch eine zelluläre Protease in die beiden Glykoproteine GP120 und GP41 gespalten wird. Beide Proteine bilden die Virushülle und fungieren damit als wichtige Strukturelemente, ohne deren korrekte Ausbildung ein Virion nicht in der Lage ist, andere Zellen zu infizieren.

Das externe Glykoprotein GP120, auch als surface (SU) - Protein bezeichnet, ist für die Adsorption des Viruspartikels an zellulären Oberflächenkomponenten (z. B. an CD4-Rezeptoren) verantwortlich. Durch seine Wechselwirkung mit den Chemokinrezeptoren CCR5 (Makrophagen) und CXCR4 (T-Helferzellen) bestimmt es den unterschiedlichen Zelltropismus (Vorliebe für bestimmte Zelltypen) einzelner HIV-Isolate. Die aus der Hülle herausragenden GP120-Proteine werden aufgrund ihrer externen Lage auch *Spikes* genannt. Jedes Virion besitzt ca. 75 von ihnen. Diese exponierte Lage ist dafür verantwortlich, dass ein Großteil der neutralisierenden humoralen Immunantwort gegen GP120 gerichtet ist. Um diesem Immundruck des Wirtes zu entgehen, besitzt das *env*-Gen die höchste Variabilität des HIV-Genoms (96). In GP120 konnten fünf hypervariable Regionen (V1, V2, V3, V4, V5) beschrieben werden, von denen dem immundominanten *V3-Loop* eine besondere Bedeutung zukommt. Er steuert das Andocken des Virions an CD4- und Chemokinrezeptoren.

Das Transmembran (TM)- Glykoprotein GP41 verankert das GP120-Protein in der Virusmembran und vermittelt durch eine Konformationsänderung die Fusion zwischen Virus- und Zytoplasmamembran.

Regulatorproteine

Die beiden Regulatorproteine TAT (Transkriptionsaktivator, P9/14) und REV (Expressionsregulator, P19) modulieren die virale Genexpression und werden daher schon in einem frühen Stadium der Virusreplikation synthetisiert. Sie sind essentielle Bestandteile der viralen Vermehrung.

Ein weiteres sehr früh gebildetes Protein ist NEF (negativer Kontrollfaktor, P25/27). Es verstärkt u.a. die Expression des Provirusgenoms durch Induktion bestimmter Signalkaskaden und aktiviert damit HIV infizierte T-Zellen.

Ebenfalls regulatorische Sequenzen für die Expression viraler Gene enthalten die LTR (*long terminal repeat*)- Gene an beiden Enden des HIV-Genoms.

Akzessorische Proteine (Hilfsproteine)

Außerdem codiert das HIV-Genom auch für sogenannte akzessorische Proteine, die zwar für die virale Vermehrung in vitro nicht essentiell sind, aber in vivo – so wird vermutet – durchaus wichtige Funktionen einnehmen könnten. Zu ihnen gehören das VPX (virales Protein X, P13/16, nur HIV-2), das VPU (virales Protein U, P14/16, nur HIV-1), das VIF (Virion-Infektiösitätsfaktor, P23) und das VPR (Virion-assoziiertes Protein R, P11/15). Man fand, dass Letzteres die Virusreplikation und die Ausbildung eines zytopathischen Effekts bei der Infektion von T-Zellen beschleunigt. Außerdem spielt es höchstwahrscheinlich eine Rolle beim Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern. Das dem VPR sehr ähnliche, nur in HIV-2 vorkommende VPX-Protein verstärkt ebenfalls die Replikationsfähigkeit der Viren, allerdings nur in Makrophagen und peripheren Blutlymphozyten. Das VIF-Protein beeinflusst die Infektiösität der Nachkommenviren, die von bestimmten Zelltypen freigesetzt werden und ist bei der Infektion von peripheren Blutlymphozyten sogar essenziell für die Produktion des infektiösen HIV. Das VPU-Protein verhindert die intrazelluläre Komplexbildung zwischen GP160 und CD4-Rezeptoren und beeinflusst damit vor allem die Freisetzung infektiöser Nachkommen.

1.3 Der retrovirale Replikationszyklus

Voraussetzung für den Zelleintritt des Virus ist der CD4-Rezeptor, der sich auf der Oberfläche von ca. 60% aller T-Lymphozyten, von T-Zell-Vorläuferzellen in Knochenmark und Thymus, Monozyten/ Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS befindet (CD4+ Zellen). Vorzugsweise befällt HIV jedoch T-Helferzellen und Makrophagen. Neben dem CD4-Rezeptor ist je nach Zelltropismus des Virus ein bestimmter Chemokinrezeptor notwendig; CCR5 für m-trope (Makrophagen befallende) und CXCR4 für t-trope (T-Zellen befallende) Viren. Die Bedeutung weiterer Korezeptoren wird noch untersucht.

Nach Zelleintritt des Virus und Freisetzung beider einsträngiger RNA-Genome aus dem Capsid („*Uncoating*“) werden diese mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, die dann in den Zellkern gelangt. Das Enzym Integrase baut hier die virale DNA in das Wirtsgenom ein, wo sie lebenslang integriert bleibt und bei einer Stimulation der infizierten Zelle durch zelluläre RNA-Polymerasen transkribiert wird.

Die Effizienz der Transkription wird entscheidend durch das regulatorische Protein TAT gesteigert. Kontrolliert durch das zweite regulatorische Protein REV gelangt die entstandene virale RNA nun ins Zytoplasma, wo sie in die Polyproteine GAG und POL translatiert wird. Das ENV-Vorläuferprotein entsteht am endoplasmatischen Retikulum, so dass es später in der Zellmembran verankert und durch eine zelluläre Protease in GP120 und GP41 gespalten werden kann. Aus den GAG- und GAG/POL-Vorläuferproteinen, den akzessorischen Proteinen und der genomischen RNA wird nun das Virion zusammengebaut und beginnt zu „knospen“, d.h. die Zelle zu verlassen. Erst später werden die GAG- und GAG/POL-Polyproteine durch die virale Protease in die Einzelproteine gespalten. Nach einem Reifungsprozess kann das freigesetzte Virus weitere Zellen infizieren.

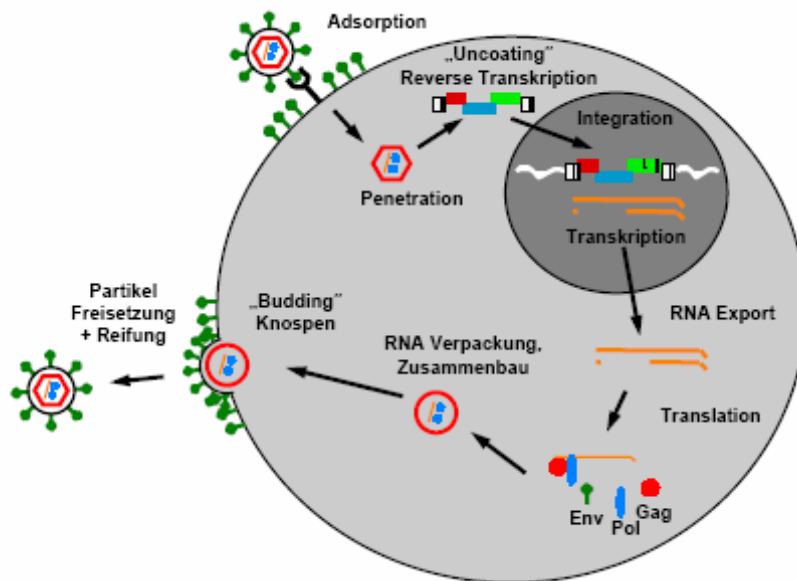


Bild 2. HIV-Entwicklungszyklus. Nach Adsorption des Viruspartikels an den CD4-Rezeptor, penetriert das Virus in die Wirtszelle, wo es seine Lipidmembran verliert („*Uncoating*“). Die freigesetzte virale RNA wird mittels Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, die nach Transport in den Zellkern durch die Integrase in das Wirtsgenom eingebaut wird. Nach der Transkription gelangt die entstandene RNA in das Zytoplasma, wo die HIV- Polyproteine generiert werden. Das Virion wird zusammengebaut, verlässt durch „Knospung“ die Zelle und kann nach einem Reifungsprozess weitere Zellen infizieren.

1.4 Klassifizierung des HIV

HIV gehört wie HTLV (Humanes T-Zell-Leukämie-Virus) zur Familie der Retroviridae und ist hier der Gattung der Lentiviren zuzuordnen. Die Bezeichnung Retrovirus bezieht sich auf die Tatsache, dass die Weitergabe der biologischen Information im Vergleich zu anderen Viren umgekehrt, nämlich von RNA zu DNA, verläuft. Eine Untergattung der Lentiviren, die *Primate Lentivirus Group*, unterteilt sich in fünf größere phylogenetische Linien. HIV-1 bildet zusammen mit SIV (*S*imian *I*mmunodeficiency *V*irus) isoliert aus Schimpansen (*Pan troglodytes*, P.t.) (SIVcpz), von dem es höchstwahrscheinlich auch abstammt, eine dieser Linien. HIV-2 gehört mit seinem nächsten Verwandten, dem SIVsm, isoliert aus Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*), in eine weitere phylogenetische Gruppe.

1.5 Das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV)

Bisher sind mindestens 18 verschiedene SIV-Stämme bekannt, die aus mindestens 20 nicht-humanen in Afrika beheimateten Primatenspezies isoliert wurden (57). Obwohl in den meisten Fällen die infizierte Affenart den natürlichen Wirt des Virus darstellt, sind auch Übertragungen von SIV zwischen unterschiedlichen Primatenspezies möglich. Ein SIV-Stamm kann in verschiedenen Spezies eine unterschiedliche Virulenz besitzen (29). Der natürliche Wirt erkrankt in der Regel nicht, ein Zeichen für die wirtsspezifische Evolution des Virus. Im Falle einer Übertragung auf eine andere Affenart kann es jedoch beim neuen Wirt zur Ausbildung eines AIDS-ähnlichen Krankheitsbildes kommen. Prinzipiell gilt, je länger eine Spezies mit dem Virus konfrontiert wurde, desto mehr sinkt seine Virulenz für diesen Wirt.

Das Schimpansenvirus SIVcpz besitzt eine Mosaikstruktur aus SIVrcm und SIVgsn. Da beide SIV-Stämme kleinere Affenarten infizieren, welche den Schimpansen als Beutetiere dienen, könnten sie über eine *cross-species*-Übertragung Schimpansen infiziert und sich dann rekombiniert haben (7). Dies beweist, dass auch Superinfektionen und damit Rekombinationen von verschiedenen SIV-Stämmen möglich sind. Afrikanische Affenarten bilden damit ein großes Reservoir an Lentiviren, die potenziell andere Spezies, inklusive den Menschen, infizieren können (57).

1.6 Die Abstammung des HIV von SIV

Weitreichend belegt ist heute die Theorie des zoonotischen Ursprungs von HIV-1/2. Die HIV-Typen entstanden durch *cross-species* Übertragungen bestimmter SIV-Stämme vom Affen auf den Menschen. Im Falle von HIV-1 war das SIVcpz, übertragen durch Schimpansen. HIV-2 dagegen stammt vom SIVsm ab, welches natürlicherweise nur Halsbandmangaben, eine Makakenart, infiziert. Man geht davon aus, dass es mindestens 10 dieser Transmissionen gab, die unabhängig voneinander abliefen. Drei Übertragungen führten demnach zu den HIV-1 Gruppen M, N und O und aus sieben weiteren entstanden die sieben HIV-2 Gruppen A bis G (148, 149). Die HIV-1 Gruppe M unterteilt sich nach heutigem Erkenntnisstand in 9 Subtypen, die erst nach der Übertragung auf den Menschen aus dem gemeinsamen Vorfahren entstanden und für die weltweite AIDS-Pandemie hauptverantwortlich sind.

Für die Abstammung von HIV-2 von SIVsm sprachen schon frühzeitig viele Faktoren. Beide Viren weisen die gleiche Genomstruktur auf, kodieren für das akzessorische Protein *vpx*, welches in keinem anderen Vertreter der *Primate Lentivirus Group* vorkommt (65) und sind auch phylogenetisch nah verwandt. Die Halsbandmangaben sind bis zu 22% mit SIVsm infiziert und in den Ländern Westafrikas sehr häufig, wo auch HIV-2 endemisch ist. Außerdem wird diese Meerkatzenart häufig gejagt, verzehrt und auch als Haustier gehalten, wodurch es zu engem Kontakt des Menschen mit infizierten Tieren kommen kann (31, 149).

Der Ursprung von HIV-1 dagegen blieb lange unklar. Bis 1999 isolierte SIVcpz-Stämme wiesen zwar die gleiche Genomstruktur wie HIV-1 auf, beide beinhalten, im Gegensatz zu den anderen Lentiviren, das Gen *vpu*. Die genetische Heterogenität zwischen beiden Viren aber war unerwartet hoch, woraus man schloss, dass Mensch und Schimpanse durch einen dritten noch unentdeckten Primaten infiziert worden sein könnten (148, 149). Diese Theorie wurde wiederlegt, als man 1999 einen neuen SIV Stamm (SIVcpzUS) aus der Schimpansenunterart *P. t. troglodytes* isolieren konnte, welcher dem HIV-1 phylogenetisch nah verwandt ist (47, 57). Zudem wurden geographische Gemeinsamkeiten im Vorkommen der HIV-1 Gruppen M, N und O und SIVcpz Infektionen beschrieben (47, 57). Heute gilt das Auftreten von HIV-1 als Folge von SIVcpz Übertragungen vom Schimpansen auf den Menschen als bewiesen.

1.7 Der Ursprung der AIDS-Pandemie

Heute ist nahezu unbestritten, dass die Übertragung verschiedener SIV-Stämme vom Affen auf den Menschen geographisch in den Urwäldern West- und Zentralafrikas stattfand. Nur hier, in Ländern, wie Gabun, Kamerun und der Demokratischen Republik (D.R.) Kongo, koziirkulieren die HIV-1 Gruppen M, N und O in der menschlichen Population, wo gleichzeitig Schimpansen mit genetisch nah verwandten SI-Viren infiziert sind (47, 56, 127). Zudem findet sich in dieser Region Afrikas auch die größte HIV-1 M Subtypendiversität (80).

Wie schon erwähnt, ergaben phylogenetische Verwandtschaftsanalysen zwischen HIV-1 und SIVcpz, dass jede der HIV-1 Gruppen M, N und O als Folge einer separaten *cross-species* Übertragung von SIVcpz auf den Menschen entstanden ist. Um den Zeitpunkt dieser Übertragung zu bestimmen, muss das Datum des gemeinsamen

Vorfahren jeder der Gruppen berechnet werden. Dahingehende Versuche beschränken sich derzeit auf die Gruppe M, dem Hauptverursacher der weltweiten AIDS-Epidemie.

Erste Berechnungen von 1988 schätzten den letzten gemeinsamen Vorfahren auf das Jahr 1960 (103). Dieser Zeitpunkt passte scheinbar gut zu dem damaligen Wissen über die Anfänge der AIDS-Epidemie und zum Datum der bisher ältesten, bekannten HIV-infizierten Blutprobe von 1959 aus Léopoldville, dem heutigen Kinshasa, in der D.R. Kongo (120, 173). Jedoch, mit bekannt werden der HIV-1 Sequenz dieser Blutprobe 10 Jahre später, welche im phylogenetischen Stammbaum inmitten der M Gruppen Subtypen zu finden war (173), wurde klar, dass der gemeinsame Vorfahr dieser Gruppe schon wesentlich früher als 1959 existiert haben musste.

Im Jahre 2000 gelang es B. Korber und ihrer Arbeitsgruppe, den letzten gemeinsamen Vorfahren auf das Jahr 1931 (Konfidenzintervall 1915-1941) zurückzudatieren. Indem sie das Datum der HIV-1 Sequenz von 1959 exakt bestimmten, bestätigten sie die Zuverlässigkeit ihres verwendeten Modells (92). M. Salemi und Kollegen kalkulierten kurz darauf das Ursprungsdatum der Gruppe M Subtypen auf 1920 (basierend auf *pol*-Sequenzen) bzw. auf 1937 (basierend auf *env*-Sequenzen). Nach ihren Berechnungen liegt der Beginn der divergenten Entwicklung von HIV-1 und SIV_{CPZ} schon mehr als 300 Jahre zurück (letzter gemeinsamer Vorfahr 1675 (Konfidenzintervall 1590-1761)) (143).

Die Berechnung der Existenz des letzten gemeinsamen Vorfahren der HIV-1 M Gruppen Viren um das Jahr 1931 herum, macht die Hypothese, die HIV-1 Epidemie wäre Ende der 50iger Jahre durch einen kontaminierten oralen Poliovirusimpfstoff ausgelöst worden, sehr unwahrscheinlich. Statt dessen gilt heute als wahrscheinlich, dass sich der Mensch durch den Haut- oder Schleimhautkontakt mit infiziertem Affenblut angesteckt hat (47). Dazu kommt es beispielsweise nach einem Affenbiss oder beim Zerkleinern oder Verzehr von rohem Affenfleisch, wie es in einigen Teilen Schwarzafrikas traditionell durchaus üblich ist. Da aber diese Verhaltensweisen nicht erst seit dem 20. Jahrhundert existieren und Affen schon sehr lange mit SIV infiziert werden, muss es solche *cross-species* Übertragungen im Laufe der Geschichte immer wieder gegeben haben. Jedoch für eine epidemische Ausbreitung der Erkrankung, wie Ende des 20. Jh. geschehen, bedarf es noch einer Reihe zusätzlicher Faktoren.

Die Kolonialisierung Afrikas brachte einschneidende Veränderungen mit sich. Zum einen erhöhte sich der Kontakt des Menschen zum Affen durch die Erschließung und Abholzung des afrikanischen Urwaldes z. B. zur Rohstoffgewinnung. Zum anderen trugen soziale Veränderungen wie Einführung von Sklavenhandel, Prostitution, Verstädterung und später im Zuge der Verbesserung der gesundheitlichen Versorgung der Gebrauch von unsterilen Kanülen für Injektionen oder Impfungen zur schnellen Ausbreitung von Viruserkrankungen innerhalb der Bevölkerung bei. Nur mit dieser seriellen Verbreitung des Virus von Mensch zu Mensch kann die progressive Entwicklung von SIV zu HIV und seine schnelle Anpassung an den neuen Wirt erklärt werden (32, 162). Erst die sozialen, wirtschaftlichen und verhaltenstechnischen Veränderungen zu Beginn des 20. Jahrhunderts schufen also die Basis für eine epidemische Ausbreitung des Virus, nachdem es durch zoonotische Übertragung vom Affen den Menschen erreichte (57).

1.8 Genetische Variabilität von HIV

1.8.1 HIV-1 und HIV-2

HIV wird unterteilt in zwei Typen, HIV-1 und HIV-2. Beide sind phänotypisch (morphologisch) nicht zu unterscheiden, der genotypische Unterschied (Basensequenz) zwischen ihnen liegt aber bei mehr als 50%. Beide HIV-Typen verursachen beim Menschen eine ähnliche Symptomatik, die in einem, als AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) bezeichneten, Krankheitsbild gipfelt, welches in 100% der Fälle zum Tode führt. Die Infektiosität und Pathogenität ist bei HIV-1, dem Verursacher der weltweiten Pandemie, größer als bei HIV-2 (53, 133). Ohne antiretrovirale Therapie führt HIV-1 in einem Zeitraum von durchschnittlich 5-12 Jahren zum Vollbild von AIDS, während dies bei HIV-2 sehr viel länger dauern kann (109, 123).

1.8.2 Die verschiedenen Gruppen von HIV-1 und HIV-2

Sowohl HIV-1- als auch HIV-2-Isolate werden je nach ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in Gruppen eingeteilt, die nach heutigem Wissensstand jeweils aus einer separaten *cross-species* Übertragung vom Affen auf den Menschen entstanden sind. Für HIV-2 handelt es sich dabei um die sieben Gruppen A, B, C, D, E, F und G,

von denen aber nur A und B zu einer nennenswerten Anzahl an Infektionen führen (30, 50, 51). HIV-1 wird in die drei Gruppen M, N und O eingeteilt. Die genetische Heterogenität zwischen den jeweiligen Gruppen beider HIV-Typen liegt bei ca. 30 bis 35%. Die HIV-1 Gruppe M (*major*) ist für die überwiegende Mehrheit der weltweiten HIV-Infektionen verantwortlich und unterteilt sich in 9 Subtypen. Trotz ähnlich hoher Heterogenität der Sequenzen innerhalb der HIV-1 Gruppe O (*outlier*) fehlt in dieser Gruppe noch eine klare Subtypeneinteilung. Infektionen sind weitestgehend begrenzt auf Gebiete West- und Zentralafrikas und besitzen eine sehr geringe Prävalenz (56, 127). In den gleichen Gebieten und mit noch geringerer Häufigkeit wird die HIV-1 Gruppe N (*new*) beschrieben (151).

1.8.3 Die Subtypeneinteilung der HIV-1 Gruppe M

Die HIV-1 Gruppe M lässt sich in die 9 Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K einteilen. A und F werden weiter in die Subsubtypen A₁, A₂ bzw. F₁, F₂ unterteilt. Man nimmt heute an, dass alle Subtypen der Gruppe M aus der Übertragung eines SIV-Stammes vom Schimpanse auf den Menschen entstanden sind, sie sich also erst im menschlichen Wirt durch Mutationen sternförmig auseinanderentwickelt haben. Sie repräsentieren unterschiedliche phylogenetische Entwicklungslinien, und trotz vieler Ungereimtheiten bietet die Einteilung in Subtypen ein nützliches Instrument zur Klassifizierung der Virus-Isolate nach ihrer genetischen Verwandtschaft. Ursprünglich wurde diese Klassifizierung, in Ermangelung an Gesamtgenomsequenzen in bestimmten Fällen, nur auf der Basis von Genomfragmenten (einzelnen Genen) vorgenommen. Heute weiß man, dass z. B. die ursprünglich als „rein“ klassifizierten Subtypen E und I, eigentlich rekombinante Viren darstellen und daher heute mit zu den CRFs (*circulating recombinant forms*) gezählt werden. Bei Subtyp E stellte sich heraus, dass sich nur die env-Region vom Subtyp A unterscheidet, der Rest des Genoms aber identisch ist (27). Daher bezeichnet man ihn seit 1998 als CRF01_AE, wobei der reine Subtyp E noch nicht isoliert werden konnte. Ebenfalls 1998 erkannte man, dass Subtyp I (94) eigentlich aus einem komplexen Mosaik der Subtypen A, G, H, K und weiteren noch unklassifizierten Regionen besteht und bezeichnet ihn seither als CRF04_cpx (48). Auch der Subtyp B würde heute nicht mehr als eigenständiger Subtyp, sondern wegen seiner nahen Verwandtschaft zum Subtyp D als D₂ klassifiziert werden.

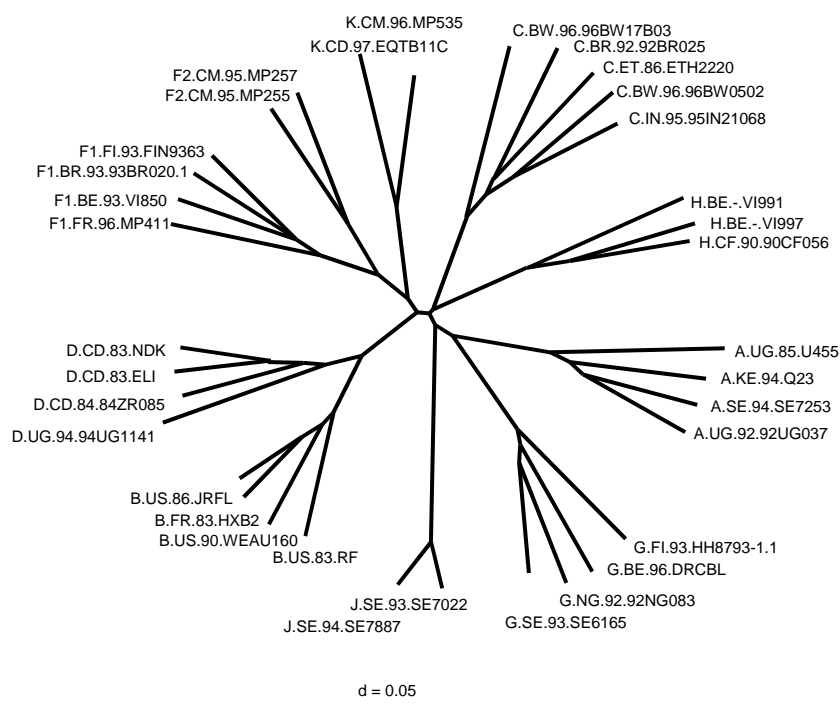


Bild 3. HIV-1 Gruppe M Subtypen. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf HIV-1 Gesamtgenom-Sequenzen der Los Alamos HIV Datenbank 1999/2000 (<http://hiv-web.lanl.gov>). Die Länge der Äste korreliert mit dem genetischen Verwandtschaftsgrad. Die Skala bezeichnet 5% Unterschied. Quelle: Mika Salminen, *Workshop on Virus Evolution*, Helsinki, 2004

Die genetische Heterogenität zwischen den Subtypen beträgt ca. 20 bis 30%, und Sequenzen innerhalb eines Subtyps oder Subsubtyps sind entsprechend näher miteinander verwandt.

Da es in den HIV-1 Gruppen O und N noch keine Einteilung in verschiedene Subtypen gibt, bezieht sich die Bezeichnung „HIV-1 Subtypen“ immer auf die Gruppe M.

1.8.4 Rekombinante Formen (Mosaik-Genome) in der HIV-1 Gruppe M

Man unterscheidet Mosaik-Viren, die aus einer Intra-Subtyp-Rekombination (Rekombination zwischen zwei Isolaten gleichen Subtyps) entstanden, von solchen, die aus einer Inter-Subtyp-Rekombination hervorgegangen sind. Letztere entstehen durch den Genomaustausch von mindestens zwei unterschiedlichen „reinen“ Subtypen oder von „reinen“ Subtypen mit einem schon rekombinanten Virus-Isolat.

In Gebieten, in denen mehr als ein Subtyp gleichzeitig zirkuliert, kommt es zur fortgesetzten Bildung von inter-subtyp-rekombinanten Viren. Der allergrößte Teil dieser Rekombinanten sind in ihrem Mosaik einzigartig. Man spricht auch von *Unique Recombinant Forms* (URFs). Sie werden regelmäßig neu gebildet und können meist nur aus dem Individuum isoliert werden, in dem sie entstanden sind. Anscheinend besitzen sie keinen speziellen Selektionsvorteil, weshalb eine weitere Ausbreitung in der Regel nicht stattfindet (39, 59, 61, 67, 68). Wird aber eine URF in eine noch HIV-naive Population getragen und kann sich dort ungehindert (konkurrenzlos) vermehren, kann es zum Entstehen einer sogenannten *Circulating Recombinant Form* (CRF) kommen (Gründereffekt). Rekombinante Isolate werden dann als CRFs bezeichnet, wenn sie eine wichtige epidemiologische Rolle bezüglich der HIV-1 Pandemie spielen und bei mindestens drei verschiedenen Individuen vorkommen, die in keiner epidemiologischen Verbindung zueinander stehen (110) (Tabelle 1).

Tabelle 1. Auflistung aller bisher bekannten CRFs mit den Referenzen, in denen sie beschrieben sind., zusammengestellt nach *Los Alamos Databases*, <http://www.hiv.lanl.gov/>

Name	beteiligte Subtypen / CRFs	Hauptverbreitungsgebiet	Referenzisolat	Referenzen
CRF01_AE	A, E	Südostasien, Zentralafrika	CM240	(27, 49, 119)
CRF02_AG	A, G	West- und Zentralafrika	IbNG	(26, 70, 102)
CRF03_AB	A, B	Russland, Ukraine	Kal153	(104, 106)
CRF04_cpx**	A, G, H, K, U*	Zypern, Griechenland	94CY032	(48, 121)
CRF05_DF	D, F	DR Kongo	VI1310	(100)
CRF06_cpx**	A, G, J, K	Westafrika	BFP90	(115)
CRF07_BC	B', C	Nordwestchina	CN54	(141, 153)
CRF08_BC	B', C	Südostchina	GX-6F	(110, 131)
CRF09_cpx**	noch nicht publiziert	Senegal, USA	96GH2911	(19, 110)
CRF10_CD	C, D	Tansania	TZBF061	(95)
CRF11_cpx**	A, CRF01_AE, G, J	Zentralafrika	GR17	(116)
CRF12_BF	B, F	Argentinien, Uruguay	ARMA159	(25, 111)
CRF13_cpx**	A, CRF01_AE, G, J, U*	Kamerun	96CM-1849	(169)
CRF14_BG	B, G	Spanien	X397	(35)
CRF15_01B	CRF01_AE, B	Thailand	99TH.MU2079	(156)
CRF16_A2D	A2, D	Kenia, Südkorea, Argentinien	KISII5009	

U bedeutet *unclassified*, **cpx bedeutet *complex* (mehr als zwei Subtypen an Mosaikstruktur beteiligt)

1.9 Epidemiologie der HIV-Infektion

Die HIV-Pandemie verläuft sowohl in ihrer Verbreitung als auch in ihrem zeitlichen Verlauf sehr heterogen. Auch in der Subtypenverteilung bestehen große Unterschiede zwischen einzelnen Regionen der Erde. Im folgenden soll ein kurzer Überblick gegeben werden.

1.9.1 Ausbreitung der Epidemie

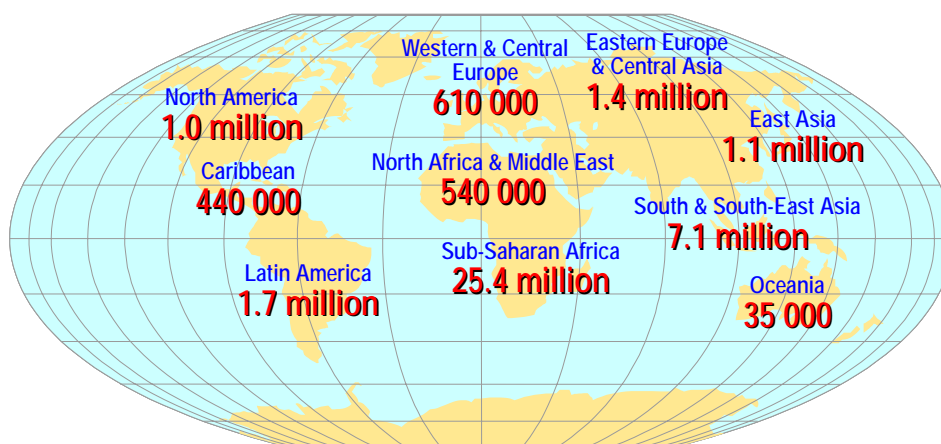
Von Afrika ausgehend werden mehrere Ausbreitungswege für HIV-1 beschrieben. Der epidemiologisch wichtigste Weg dürfte der „Export“ des Virus nach Haiti sein. Nach der Unabhängigkeit der Demokratischen Republik Kongo (zuvor Zaire) im Jahre 1960 halfen haitianische Fachkräfte im Land, ein Verwaltungssystem aufzubauen. Nach ihrer Rückkehr in das Heimatland verbreitete sich HIV-1 in Haiti. In den 70er Jahren galt dieses Land als beliebtes Ferienziel für Touristen aus den USA, die auf diesem Wege das Virus in die Vereinigten Staaten brachten.

Über das weltweit gespannte Netz der Risikogruppen der homosexuellen Männer und der von intravenösen Drogen abhängigen Menschen, breitete sich HIV-1 global aus. Dies geschah in den verschiedenen Populationen immer nach dem gleichen Schema. Ausgehend von einer Durchseuchung der Risikogruppen innerhalb weniger Monate wurde das Virus dann auf die „Normalbevölkerung“ übertragen. Wie hoch der Grad der Durchseuchung in der Normalbevölkerung werden kann, hängt von mehreren in ihrem komplexen Zusammenwirken noch nicht genau erforschten Faktoren ab(21-23). Auffällig ist jedoch, dass sich HIV in, sehr von der Außenwelt abgeschotteten, Staaten wie der UdSSR oder der Republik Südafrika erst mit dem Zusammenbruch der totalitären Regime und den damit verbundenen Unruhen ausbreitete.

Nach der epidemischen Ausbreitung von HIV-1 im Afrika südlich der Sahara in den 70er Jahren, begann um 1980 die Epidemie auch in der Karibik, in Nord- und Südamerika und wenig später auch in Westeuropa und Australien. In der zweiten Hälfte der 80er Jahre wurde dann Nordafrika, Asien und der pazifische Raum heimgesucht. Ab Anfang der 90er Jahre breitete sich das Virus auch in den Ländern des ehemaligen Ostblocks mit einer hohen Dynamik aus (158).

1.9.2 Weltweite Verbreitung und Prävalenz von HIV-1

Laut UNAIDS wird die Zahl HIV infizierter Menschen im Dezember 2004 weltweit auf gut 39 Millionen Menschen geschätzt. Ca. 45% davon sind Frauen und gut 5% Kinder unter 15 Jahren. Die durchschnittliche Prävalenz unter den Erwachsenen (>15 Jahre) beträgt 1,1%, wobei Schwarzafrika mit durchschnittlich 7,4% am stärksten betroffen ist, gefolgt von der Karibik mit 2,3%. Alle anderen Regionen verzeichnen eine Infektionshäufigkeit von <1%. Weltweit haben sich 2004 fast 5 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert und gut 3 Millionen starben an den Folgen von AIDS.



HIV-Infizierte total: 39.4 Millionen

Neuinfektionen 2004: 4.9 Millionen

Todesfälle 2004: 3.1 Millionen

Bild 4. Geschätzte Anzahl HIV-Infizierter in den verschiedenen Regionen, Quelle: UNAIDS 2004

1.9.3 Verbreitung und Prävalenz von HIV-2

Weniger als 1 % aller weltweit diagnostizierten HIV-Infektionen werden durch HIV-2 hervorgerufen. HIV-2-Infektionen kommen vor allem in Ländern Westafrikas vor. In 10 afrikanischen Ländern liegt die HIV-2-Prävalenz bei den 15 bis 49 Jährigen über 1%. Außerhalb Afrikas sind autochthone, nicht importierte HIV-2-Infektionen extrem selten. In den USA wurde der erste Fall im Jahre 1987 entdeckt. Seither wurden 79 HIV-2-Infektionen in den USA registriert, wobei 52 dieser Menschen aus Westafrika stammten und nur sieben in den USA geboren wurden (28).

1.9.4 Weltweite HIV-1 Subtypenverteilung

Der weltweit am häufigsten auftretende Subtyp C (>50%) ist vor allem im südlichen Afrika, in Äthiopien und Somalia und in Indien verbreitet. Ihm folgt Subtyp A mit einer Prävalenz von 23% und einer Verbreitung vor allem in den Ländern Zentral- und Westafrikas und Osteuropas. Seit dem Beginn der dortigen Epidemie um 1994/95 in Kaliningrad breitet er sich dort rasant aus (159, 160). Der weltweit Dritthäufigste ist Subtyp B, welcher die große Mehrheit der HIV-Infektionen in den Industrieländern verursacht.

Tabelle 2. Prozentualer Anteil der HIV-1 Subtypen weltweit

Subtyp /CRF	Weltweites Vorkommen
Subtyp C	> 50 %
Subtyp A	> 20 %
Subtyp B	5 – 10 %
Subtyp D	< 5 %
CRF01_AE	~ 5 %
alle anderen	~ 5 %

Außer den reinen Subtypen spielen auch rekombinante Viren eine immer größere Rolle. Man vermutet, dass weltweit mehr als 10-20% aller HIV-Infektionen durch rekombinante Formen verursacht werden (140). In einigen Ländern beträgt der Anteil sogar weit über 30% (59, 68), und in Kambodscha können fast 100% aller HIV-Infektionen auf CRF01_AE zurückgeführt werden.

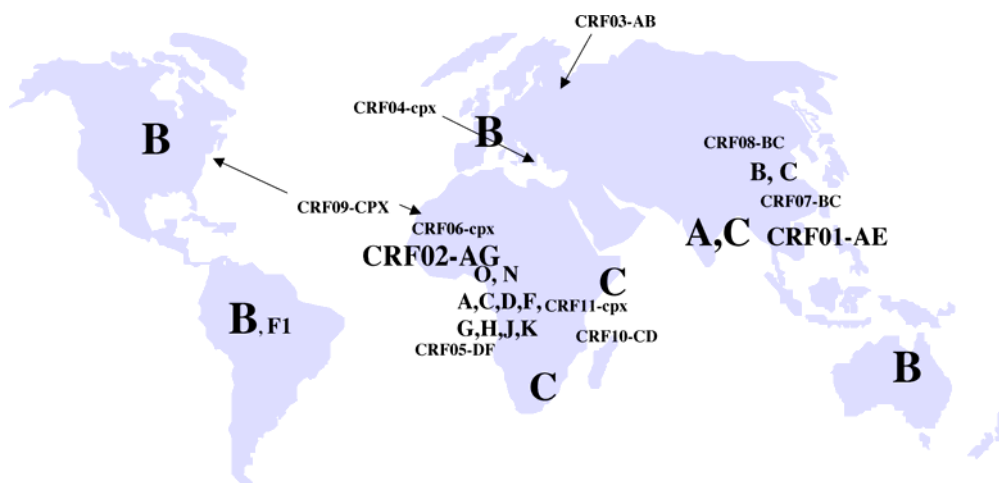


Bild 5. Weltweite HIV-Subtypenverteilung (125)

1.9.5 Verbreitung und Prävalenz von HIV-1 in Afrika

Afrika, besonders der, südlich der Sahara gelegene, Teil, ist mit insgesamt ca. 26 Millionen HIV infizierten Menschen der von der Pandemie bisher am stärksten betroffene Kontinent. Rund 70% aller erwachsenen HIV Infizierten und sogar über 80% aller infizierten Kinder unter 15 Jahren leben hier, obwohl Afrikas Anteil an der Weltbevölkerung gerade knapp über 10% liegt (160).

Retrospektiv konnte nachgewiesen werden, dass bereits um 1980 im damaligen Zaire und in Uganda gehäuft AIDS-Erkrankungen auftraten (34, 130, 134, 147). Allerdings kam es in den darauf folgenden Jahren in diesen Ländern „nur“ zu einer moderaten Ausbreitung, die hier zu weit geringeren HIV-Prävalenzen führte als in anderen afrikanischen Staaten (159).

Ab Mitte der 80er Jahre stieg vor allem in den ostafrikanischen Ländern wie Tansania die Anzahl der HIV Infektionen stark an. Zu diesem Zeitpunkt war die Epidemie noch nicht ins südliche Afrika vorgedrungen, wo es erst Ende der 90er Jahre zu einer zuvor noch nicht gesehenen explosionsartigen Ausbreitung der Krankheit kam. Bis heute ist diese Region die durch die AIDS-Pandemie am schwersten betroffene der Welt.

Ausbreitung von HIV zwischen 1984 und 1999 in Afrika

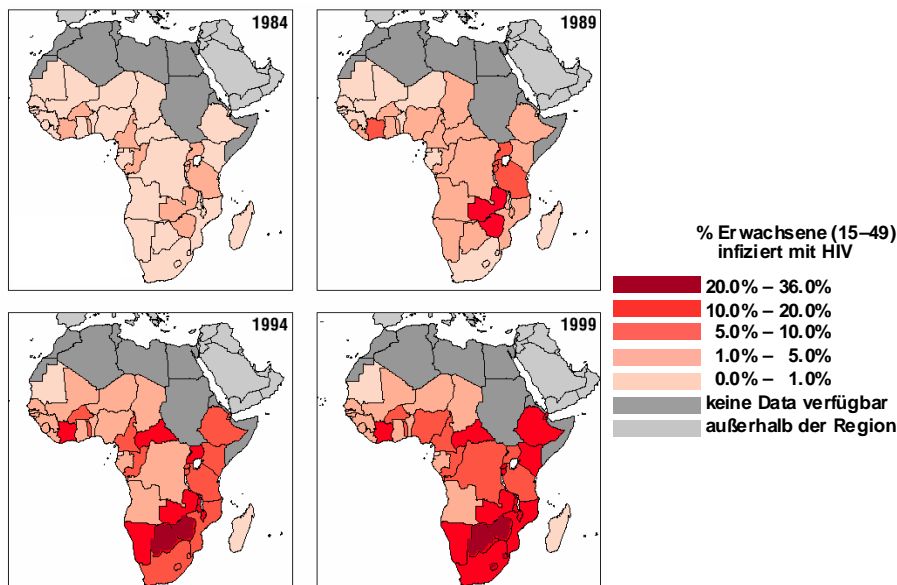
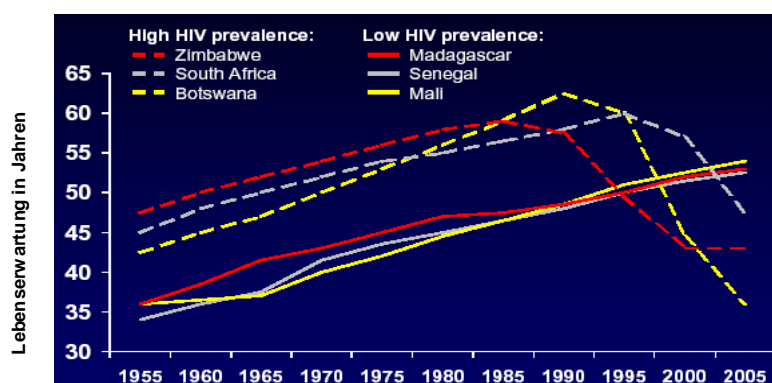


Bild 6. Ausbreitung von HIV in Afrika zwischen 1984 und 1999, adaptiert nach UNAIDS

Die Prävalenzraten in Afrika variieren regional zum Teil erheblich, mit höheren Werten in Richtung Osten und Süden. Zurzeit halten Botswana und Swasiland den traurigen Rekord mit HIV-Prävalenzen von bis zu 38,8% bei den 5-49 Jährigen (159). Diese hohe Durchseuchung der Bevölkerung einiger Länder führte zu einer drastischen Abnahme der Lebenserwartung, teilweise auf unter 40 Jahre, verbunden auch mit entsprechenden ökonomischen Konsequenzen für die Zukunft (139).

Auswirkung von HIV/AIDS auf die Lebenserwartung in Afrika



Quelle: UN Department of Economic and Social Affairs 2001

Bild 7. Auswirkung der HIV-Epidemie auf die Lebenserwartung in Afrika in Populationen mit hoher und niedriger HIV-Durchseuchung

Von der Pyramide zum Atompilz: Botswana 2020

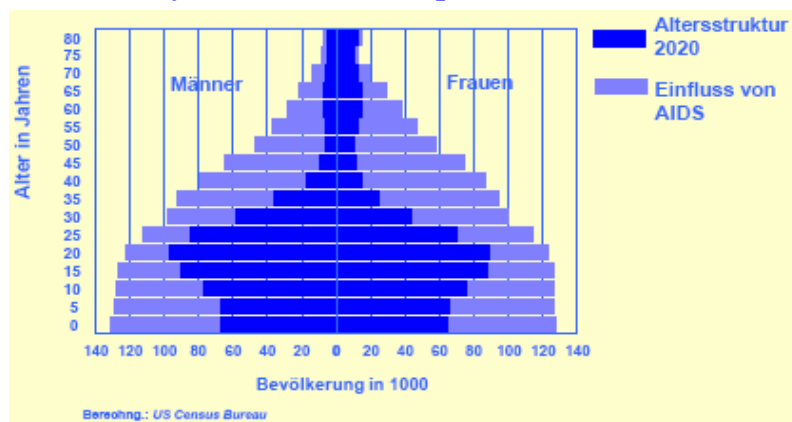


Bild 8. Einfluss von AIDS auf die Bevölkerungsstruktur in Botswana im Jahre 2020

Während das derzeit weltweit am stärksten betroffene südliche Afrika immer noch fest im Griff der AIDS Epidemie bleibt ohne nennenswerte Anzeichen eines Rückgangs der HIV-Prävalenzen, gibt es im östlichen Afrika auch einige Lichtblicke. In Uganda beispielsweise fiel die nationale HIV-Prävalenz von 13% Anfang der 90er Jahre auf nur noch 5% Ende 2003. Auch in Kenia, Burundi und Äthiopien gibt es Anzeichen für einen Rückgang der HIV-Infektionen in der Bevölkerung, wenn auch einen sehr moderaten (160).

1.9.6 Verbreitung und Prävalenz von HIV-1 in Tansania

Im Gegensatz zu anderen Ländern Ostafrikas gibt es in Tansania noch keine Anzeichen für einen landesweiten Rückgang der HIV-Infektionen. Immerhin, in der Region Mbeya, die während des letzten Jahrzehnts im Blickpunkt intensiver Präventionsbemühungen stand, fiel die HIV-Prävalenz bei den 15-24-Jährigen von 20,5% 1994/95 auf 14,6% im Jahre 2000. Gleichzeitig verzeichnete man einen Anstieg beim Gebrauch von Kondomen und bei der Behandlung sexuell übertragbarer Krankheiten. In Regionen dagegen, in denen die Bemühungen zur Prävention eher sporadisch waren, stiegen die Zahlen weiter an, wie im benachbarten Rukwa von 22,5% 1994 auf 30,2% 1999 in der gleichen Altersgruppe (82, 160).

Die ersten AIDS-Fälle traten in Tansania 1983 in der Region Kagera, im Nordwesten des Landes auf. Da bis 1987 mehr als 60% aller an AIDS erkrankten Tansanier aus dieser Region stammten (113), nimmt man an, dass sich das Virus vom benachbarten Uganda über die Grenzregion Kagera in ganz Tansania ausbreitete.

Als Folge betrug schon 1987 die HIV-Prävalenz in der Hauptstadt Daressalaam 3,6% unter den Schwangeren, 5,2% bei den Blutspendern, und von den Barfrauen waren sogar schon 29% infiziert (113). Bis 2001 stieg die Anzahl HIV-infizierter Erwachsener auf durchschnittlich 7,8% und die HIV-Prävalenz unter den Kindern jünger als 15 Jahre sogar auf 11,3% (157).

1.10 Molekulare Evolution von HIV-1

HIV-1 liegt in vivo als sogenannte *quasispecies* vor, einer Population von nahe verwandten, aber genetisch nicht identischen Viren (40, 165). Die Variabilität innerhalb der HIV-1 *quasispecies* eines Patienten liegt bei 3-5%, und über einen Zeitraum von 10

Jahren kann sich das HIV-Genom sogar um bis zu 10% von dem des ursprünglichen Virus verändern (93). Verursacht wird diese genetische Heterogenität zum einen durch die kontinuierliche Akkumulation von Mutationen, die eher zu allmählichen Wandlungen der biologischen Eigenschaften des Virus führen. Im Gegensatz dazu rufen Rekombinationen sehr abrupte genetische Veränderungen hervor mit schneller Generierung viraler Variabilität.

1.10.1 Mutationen

Die hohe Variabilität des HIV-1 Genoms ist u.a. eine Folge des kontinuierlichen Auftretens von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen. Die hohe Mutationsrate von 0,3 Nukleotidsubstitutionen pro HIV-Genom pro Replikationszyklus (81) wird u.a. verursacht durch die fehlerhafte DNA-Synthese des viralen Enzyms Reverse Transkriptase, das keinen 3'-5'-Korrekturmechanismus besitzt (9, 16, 72). Im Gegensatz dazu verursacht die DNA-Polymerase mit einem Korrekturmechanismus während des zellulären Replikationszyklus nur eine Mutation pro 10^{-11} Basenpaare (164).

Resultieren die Mutationen in einem Aminosäurewechsel, so spricht man von nicht synonymen Mutationen. Alle anderen werden als stille oder synonyme Mutationen bezeichnet.

Der Austausch zwischen Purin- (A, G) oder Pyrimidin- (C, T) Basen wird als Transition, eine Mutation von Purin- zu Pyrimidinbasen oder anders herum als Transversion bezeichnet. Aus sterischen Gründen treten Transitionen ungefähr doppelt so häufig auf wie Transversionen, obwohl sie bei einer zufälligen Verteilung von Mutationen nur halb so wahrscheinlich sind. Transitionen führen eher zu synonymen Mutationen, während Transversionen normalerweise eher einen Aminosäurewechsel zur Folge haben. Letztere sind für die Evolution von größerer Bedeutung, da sie sowohl die chemischen als auch die biologischen Eigenschaften des entsprechenden Proteins verändern können. Je positiver sich die Mutation auf die Fitness des Virus auswirkt und je größer der Selektionsdruck durch Immunsystem oder antiretrovirale Therapie ist, desto eher wird die Mutation in der Viruspopulation fixiert und weitervererbt.

Ein Maß für die aufeinanderfolgende Fixierung von Mutationen pro Zeit ist die sogenannte Evolutionsrate (Nukleotidveränderungen pro Genomposition pro Jahr).

Bedingt durch eine hohe Mutationsrate kombiniert mit einer kurzen Generationszeit ist sie bei HIV-1 besonders hoch und beträgt, abhängig von den analysierten Sequenzen, z.B. 6×10^{-4} für das *pol*-Gen und 10^{-3} für *env* (143). Das entspricht in *pol* circa 0,6 Mutationen / 1000 bp und in *env* circa 1 Mutation / 1000 bp pro Jahr.

Eine besondere Art der während der reversen Transkription eingeführten Nukleotidsubstitutionen sind die sogenannten Hypermutationen. Dabei baut das Enzym anstelle von dGTP vermehrt das Nukleotid dATP in den DNA-Strang ein, was zu einem überdurchschnittlich hohen prozentualen Anteil von Adenin im Virusgenom führt. Aufgrund dessen suggerieren diese Sequenzen in einem phylogenetischen Baum einen zu großen evolutionären Abstand zu den anderen Virusvarianten (101, 161, 172).

1.10.2 Rekombinationen

Da jedes Viruspartikel zwei RNA Stränge enthält und die Reverse Transkriptase während der Umschreibung von RNA auf DNA zwischen diesen beiden durchschnittlich dreimal pro Genom hin und her springt (3, 81), kann es im Zuge jedes Replikationszyklus zu Rekombinationen kommen. Bei einer Einfachinfektion der Zelle mit HIV-1 verändert sich das Genom dabei nicht, da beide RNA-Genome eines Virus identisch sind.

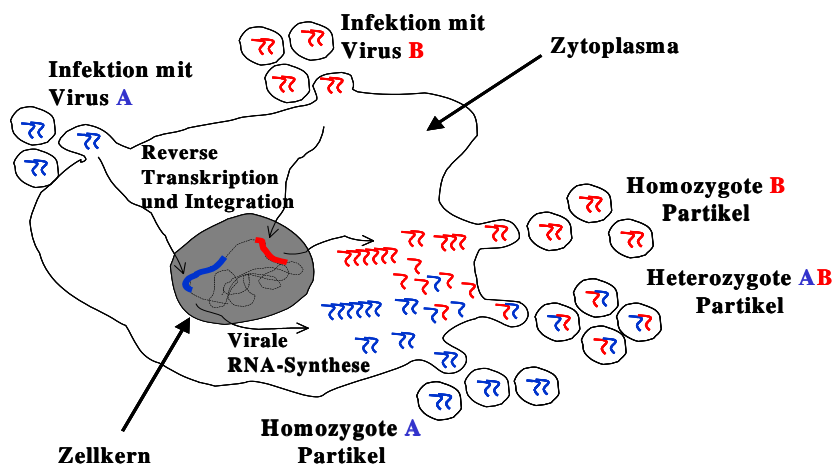
Vor einigen Jahren konnte nun aber an infizierten Zellen der Milz gezeigt werden, dass 75-80% aller Zellen mit zwei oder mehr Proviren gleichzeitig infiziert waren (84). Im Falle einer solchen Mehrfachinfektion der Zelle führen Rekombinationsereignisse zu neuen viralen Genomen, welche die genetische Information beider Proviren beinhalten (Bild 9). In vitro Studien haben gezeigt, dass Rekombinationen zwischen zwei verschiedenen retroviralen Partikeln schon zwei Wochen nach der Doppelinfektion nachgewiesen werden können (170).

Je heterogener die, die Zelle infizierenden, Viren sind, desto drastischer ist die plötzliche Genomveränderung und damit die Auswirkung auf die biologischen Eigenschaften des Virus. Rekombinationen zwischen verschiedenen HIV-1 Subtypen beispielsweise können in kürzester Zeit zu einer Erhöhung der viralen Variabilität führen. Dies gibt dem Virus die Möglichkeit einer besseren Anpassung, um dem Selektionsdruck des Immunsystems und einer eventuellen antiretroviralen Therapie zu entgehen.

Die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen variiert in den verschiedenen Genombereichen und ist besonders hoch in den sogenannten *hot spots*. Dazu gehören Bereiche der Reversen Transkriptase, das *vif*- und *vpr*-Gen, die ersten Exons von *tat* und *ref*, das *vpu*-Gen, GP41 und die C2-Region von GP120 (44, 108).

Einer Reihe von Veröffentlichungen zu Rekombinationen zwischen den Subtypen der Gruppe M (39, 59, 68, 95, 137, 145, 153) stehen bislang nur sehr wenige Publikationen zu Intra-Subtyp-Rekombinationen gegenüber (132, 154).

(A) Doppelinfektion einer Zelle: Entstehung heterozygoter Nachkommen



(B) Reinfektion mit heterozygoten Viren: RNA Rekombination

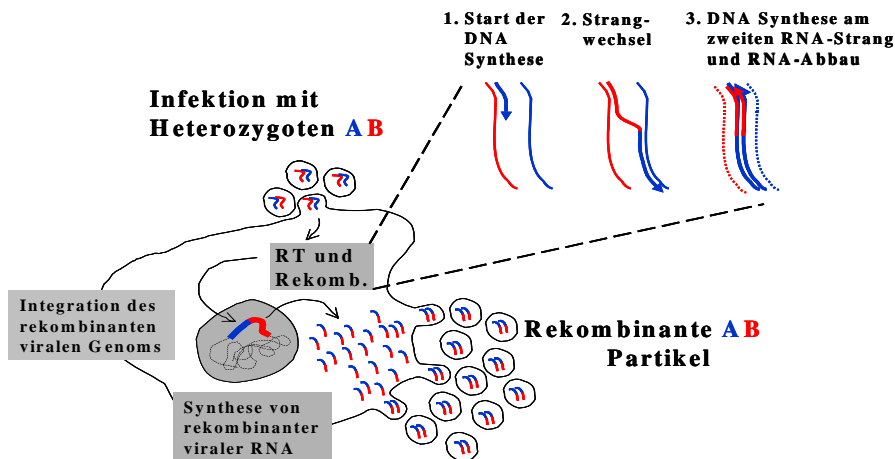


Bild 9. Retrovirale Rekombination. (A) Nach der Doppelinfektion einer Zelle mit zwei HIV-Strängen A und B werden nach reverser Transkription beide Genome in das der Wirtszelle integriert. Es entstehen homozygote und heterozygote virale Partikel. (B) Infizieren die heterozygoten Viren weitere Zielzellen, können durch einen RNA-Strangwechsel während der Reversen Transkription rekombinante Proviren entstehen. Aus ihrer Integration und Expression resultieren rekombinante Nachkommen. Adaptiert von Mika Salminen, *Workshop on Virus Evolution*, Helsinki, 2004

1.10.3 HIV-1 Mehrfachinfektionen

Mehrfachinfektionen mit HIV-1 können einerseits durch die simultane oder sehr zeitnahe Übertragung von zwei Virusvarianten vor der Serokonversion (Bildung von Antikörpern) entstehen. Neben dieser Möglichkeit der Koinfektion kann es aber auch zu einer Superinfektion kommen. Dabei wird ein bereits HIV-1 infiziertes Individuum erst nach Ausbildung einer Immunantwort mit einem weiteren HIV-Stamm infiziert. Eine Mehrfachinfektion mit unterschiedlichen HIV-Varianten ist die Voraussetzung für die Bildung von Mosaikgenomen durch Rekombination.

Schon früh konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass Doppelinfektionen sowohl zwischen den beiden Virustypen HIV-1 und HIV-2 (4, 122, 126), zwischen den HIV-1 Gruppen M und O (61, 153), als auch zwischen verschiedenen (6, 10, 77, 79, 136, 155, 171) und gleichen (20, 38, 71, 174) Subtypen der Gruppe M möglich sind. Alle diese Befunde sind Zufallsbefunde, eine systematische Studie zur Evaluierung von Doppelinfektionen ist bis heute nicht publiziert. Interessanterweise sind trotz der berichteten Doppelinfektionen zwischen HIV-1 und HIV-2 noch keine Rekombinationen zwischen diesen beiden Virustypen beschrieben worden (14), wohl aber zwischen den HIV-1 Gruppen M und O (128).

Superinfektionen konnten bisher in Viruskulturen sowie bei Schimpansen und Makaken induziert werden (43, 85, 86, 98, 124, 167). Seit 2002 sind mindestens fünf HIV-Superinfektionen beim Menschen beschrieben worden, die alle erst nach dem Vorhandensein einer ausgeprägten Immunantwort auftraten (2, 83, 90, 135). Es gibt Hinweise darauf, dass eine HIV-1 Mehrfachinfektion zur synergistischen Verwendung von Korezeptoren durch beide Viren führen und einen schnelleren Krankheitsverlauf nach sich ziehen kann (54, 166). Dies kann aber bisher nicht verallgemeinert, sondern muss noch genauer evaluiert werden.

Mehrfachinfektionen und Rekombinationen von HIV-1 stellen ein Problem für die Kontrolle der Resistenzentwicklung gegen die antiretrovirale Therapie dar. Während es bei einer Mehrfachmedikation und guter Compliance sehr unwahrscheinlich ist, dass Mutationen gleichzeitig an verschiedenen Stellen des Genoms auftreten und so eine Multiresistenz ermöglichen, wird die Wahrscheinlichkeit durch den Austausch von ganzen Genomregionen beträchtlich erhöht. Nach der Superinfektion eines Individuums

mit einer multiresistenten HIV-Variante kann eine erfolgreiche Therapie sogar innerhalb kürzester Zeit unwirksam werden (55, 118).

Die Erkenntnis, dass Ko- und Superinfektionen gar nicht so selten auftreten wie anfangs angenommen, hat möglicherweise weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung eines wirksamen präventiven Impfstoffs gegen HIV.

1.11 Strategien zur Impfstoffentwicklung

Auch rund 20 Jahre nach der Entdeckung des Erregers der Immunschwächekrankheit AIDS steht kein effektiver Impfstoff gegen HIV zur Verfügung. Wirksame antiretrovirale Therapie ist zwar im Stande, den Krankheitsverlauf zu verzögern und durch Senkung der Viruslast die Ansteckungsgefahr für weitere Menschen zu reduzieren, ist aber aus Kostengründen für die Mehrheit der HIV Infizierten nicht verfügbar. Zudem ist u.a. bedingt durch starke Nebenwirkungen die Compliance bei der Einnahme der Medikamente oft unzureichend mit der Folge von möglichen Resistenzbildungen unter den im Körper persistierenden Viren. Eine sichere, hochwirksame und kostengünstige Schutzimpfung ist also dringend erforderlich in Anbetracht einer Pandemie, im Zuge der sich, trotz groß angelegten Aufklärungs- und Präventionskampagnen, weltweit immer noch durchschnittlich 600 Menschen pro Stunde neu mit HIV infizieren.

1.11.1 Biologische Eigenschaften von HIV und Probleme bei der Entwicklung eines Impfstoffs

Seit der Entdeckung des ersten Impfstoffs – damals gegen die Pocken – sind mehr als 200 Jahre vergangen, in denen es Wissenschaftlern gelungen ist, wirksame Impfstoffe gegen zahlreiche Viruserkrankungen, wie Masern, Mumps, Röteln, Windpocken, Gelbfieber und Influenza zu entwickeln. HIV-1 erweist sich aus verschiedenen Gründen als weitaus schwierigeres Ziel für die Impfstoffentwicklung.

Seine große Variabilität ermöglicht es HIV immer wieder, der humoralen und zellulären Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Die kontinuierliche Bildung von Fluchtmutanten, die bis zu einem gewissen Grade den akuten immunologischen Angriffen entgehen und sich verstärkt vermehren, macht es dem Immunsystem unmöglich, das Virus vollständig zu eliminieren. Die hohe Replikationsrate von HIV

vergrößert noch die Chancen einer zufällig günstigen Mutation unter der Nachkommenschaft.

Durch den Befall und die Zerstörung von CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) können sich sowohl die durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) als auch die durch B-Lymphozyten vermittelten Anti-HIV Immunantworten verändern (168).

Die besonders stark ausgeprägte Heterogenität der Hüllproteine GP120 und GP41 verhindert die Bildung einer breiten Immunantwort durch kreuzreaktive, neutralisierende Antikörper. Bedingt durch die Glykosylierung dieser Proteine und die versteckte Lage der Rezeptorbindungsstelle sind die Zielstrukturen für solche Antikörper nur schwer zu erreichen (168).

Trotz dieser Hindernisse halten es die meisten Experten für möglich, einen wirksamen Impfschutz zu entwickeln. Dafür sprechen die lange Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit, die Existenz sogenannter *Longterm-Nonprogressors* (LTNP), deren Immunsystem das Virus jahrzehntelang kontrollieren kann (58, 89, 150) und Personen, die trotz eines hohen Infektionsrisikos seit langer Zeit HIV negativ sind und offenbar eine natürliche Immunität besitzen (129, 142).

Außerdem ist es wichtig, Methoden zu entwickeln, mit denen eine genaue Charakterisierung der viralen Population, auch über einen längeren Zeitraum, in Regionen und einzelnen Individuen möglich ist, um Rückschlüsse auf die Mechanismen der Virusevolution ziehen zu können. Dazu soll auch die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

1.11.2 Bisherige Impfstoffansätze

Nach heutigem Wissensstand wird für einen effektiven HIV-Impfstoff sowohl der Aufbau einer zellulären als auch einer humoralen Immunantwort benötigt. Antikörper sind der einzige Weg, Viren vor der Infektion einer Zielzelle zu neutralisieren. Außerdem können sie in hohen Konzentrationen im Serum vorkommen und stehen im Falle einer Infektion sofort zur Verfügung. Dagegen benötigt die Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten einige Tage, da Populationen von Gedächtniszellen aktiviert werden und sich im Körper verteilen müssen.

CTLs erkennen Viren nur in infizierten Zellen, die mit Hilfe von MHC-Rezeptoren Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Welche dies sind, hängt u. a. vom jeweiligen MHC-Typ der infizierten Person ab. Deshalb sollte ein Impfstoff möglichst viele virale Antigene enthalten, um eine breite zelluläre Immunantwort hervorzurufen.

Die beiden herkömmlichen Ansätze der Impfstoffentwicklung, attenuierte oder inaktivierte Viren, werden wegen Sicherheitsbedenken ausgeschlossen. Das Risiko, dass Impflinge durch unvollständig abgetötete Pathogene infiziert werden oder abgeschwächte Stämme wieder zu pathogenen Viren mutieren könnten, ist zu groß. Mittlerweile existieren aber eine Reihe von sicheren Alternativen, und seit 1987 wurden schon über 40 potenzielle Impfstoffkandidaten in klinischen Studien getestet.

Da sich die meisten Antikörper von infizierten Personen gegen die Hüllproteine GP120 und GP41 des Virus richten, werden diese in potenziellen Impfstoffen als rekombinante Proteine verwendet. In Studien der Phase I und II erwiesen sich die Kandidaten als sicher und immunogen. Vor einer Infektion schützen sie allerdings nur unzureichend, wie aus den Ergebnissen einer klinischen Studie in USA und Thailand hervorgeht. Hier wurde ein Kombinationsimpfstoff aus den GP120 Proteinen gegen den Subtyp B und CRF01_AE (AIDSVAX) getestet (74).

Dieser wurde für eine weitere Studie der Phase III mit einem DNA-Impfstoff, der die Gene *gag/pol* gegen Subtyp B und das *env*-Gen gegen CRF01_AE integriert in das *Canarypox* Virus, enthält, kombiniert. In einem sogenannten „Prime/Boost“-Regime erfolgt eine erste Immunisierung mit dem DNA-Impfstoff, der mehrere Booster-Dosen des rekombinanten Proteins folgen. Dadurch soll neben einer Antikörperreaktion auch eine zytotoxische T-Zellantwort erhalten werden. Die Ergebnisse stehen allerdings noch aus.

Als virale Vektoren können auch modifizierte *Vaccinia*-Stämme (MVA) oder Adenoviren dienen. Alle bisher getesteten Vektoren erwiesen sich als sicher und immunogen. Die durch die Impfung hervorgerufenen CTL-Antworten waren kreuzreaktiv und konnten verschiedene HIV-1 Subtypen erkennen und abtöten. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der Antikörperreaktion. Allerdings scheint eine zelluläre Immunantwort eine Infektion nicht verhindern zu können, sondern reduziert

lediglich die Viruslast. Würde sich dies bestätigen, käme dieser Vakzine-Typ als Monoimpfstoff nur für einen sogenannten therapeutischen Impfstoff in Frage.

Als Baktinfektion wird eine Methode bezeichnet, bei der HIV-DNA in bakterielle Vektoren integriert wird. Momentan wird dazu ein Salmonellen-Stamm genetisch modifiziert. Bakterien haben gegenüber Viren den Vorteil, dass sie deutlich größere Mengen an DNA aufnehmen und in die Zielzellen transportieren können. Außerdem sind sie sehr stabil (orale Gabe möglich) sowie einfach und preiswert herzustellen, ideale Eigenschaften eines Impfstoffs, der vor allem in Entwicklungsländern benötigt wird. Erste klinische Studien mit bakteriellen Vektoren sind bereits angelaufen (37).

Bei Impfstoffen, die nur nackte HIV-DNA enthalten, ergibt sich das Problem des Transportes des genetischen Materials in die Zielzelle. Eine chinesische Forschungsgruppe verband die HIV-DNA mit genetischem Material des Affenvirus SV40 und konnte in Mäusen eine Immunreaktion auf HIV hervorrufen. Als Nächstes muss nun die Wirksamkeit am Menschen getestet werden (76).

In den USA beschäftigt sich eine Arbeitsgruppe am *National Cancer Institute* mit nackter DNA, die zwei HIV-Gene und ein Adjuvans enthält. Erste Versuchsreihen mit Affen ergaben, dass eine Infektion zwar nicht verhindert werden, ein solcher Impfstoff aber eventuell eine infizierte Person vor dem Ausbruch von AIDS schützen kann (76).

Obwohl allein im Jahr 2004 fünfzehn neue Versuchsreihen zum Test von potenziellen HIV-Impfstoffen gestartet wurden (75), gilt keiner der Kandidaten als lang ersehnte „Wunderwaffe“ und viele weitere Forschungsaktivitäten werden nötig sein, um einen in den Entwicklungsländern einsetzbaren, effektiv wirksamen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln.

2 Problemstellung und Zielsetzung

HIV-1 besitzt eine hohe genetische Variabilität. Neben der kontinuierlichen Akkumulation von Punktmutationen, die eher zu allmählichen Wandlungen der biologischen Eigenschaften des Virus führen, spielen Rekombinationen, insbesondere zwischen unterschiedlichen HIV-1 Subtypen, eine große Rolle in der Virusevolution. Durch den Austausch ganzer Genomabschnitte können sie sehr abrupte genetische Veränderungen hervorrufen mit entsprechend drastischen Konsequenzen, wie der raschen Bildung von Fluchtmutanten oder Resistenzen gegen antiretrovirale Therapie. Die Voraussetzung für Rekombinationen ist die Koinfektion eines Individuums mit mehr als einer HIV-1 Variante.

Die Identifizierung und Charakterisierung von HIV-1 Mehrfachinfektionen und Rekombinationen mittels geeigneter Methoden liefern wertvolle Hinweise für das Verständnis der molekularen Evolution des Virus im Laufe der Infektion und tragen in Korrelation mit Untersuchungen der Immunantwort des Wirtes zur Entwicklung eines protektiven Impfstoffes bei. Die Beschreibung von Subtypenverteilungen bildet eine wichtige Grundlage für die Charakterisierung der epidemiologischen Ausbreitungswege in Bevölkerungsgruppen und geographischen Regionen.

1) Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die genetische Variabilität von HIV-1 in einer Hochrisikobevölkerungsgruppe von Barfrauen in Tansania zu analysieren. Es soll die HIV-1 Subtypenverteilung mit besonderem Fokus auf rekombinanten Formen und Doppelinfektionen beschrieben und mit vorhandenen Daten über frühere Hochrisikogruppen und über die Normalbevölkerung verglichen werden. Für die Subtypisierung findet der MHA_{ACD} (*Multiregion-Hybridisation-Assay* für die Subtypen A, C und D) Anwendung, eine neue molekularbiologische Methode, die im Rahmen dieser Studie erstmals für eine größere Probenanzahl eingesetzt werden soll. Im Zuge dessen werden Aussagen zur Funktionalität des Assays als schnellen und spezifischen Screeningtest für HIV-1 Subtypen in Tansania erwartet.

2) Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die detaillierte Analyse der viralen *quasispecies* in einer mehrfach mit HIV-1 infizierten Studienteilnehmerin. Es soll der

Zeitraum ihres letzten Lebensjahres untersucht werden, innerhalb dessen sie, anfangs klinisch gesund, das Vollbild von AIDS entwickelte und wenig später der Krankheit erlag. Besonderer Wert soll auf das Ausmaß von Rekombinationen und Mutationen in diesem späten Infektionsstadium, die Rekombinationsmuster der molekularen Formen und die daraus resultierende Heterogenität in der viralen *quasispecies* gelegt werden. Desweiteren sollen eventuelle Veränderungen in der genetischen Variabilität des Virus über den Untersuchungszeitraum aufgezeigt und die drei untersuchten Genomregionen miteinander verglichen werden.

3) Ausserdem soll die für die Detailanalyse der mehrfach mit HIV-1 infizierten Person eingesetzte PCR mit multiplen Primerpaaren auf ihre Sensitivität im Vergleich zu einem regulären PCR Ansatz untersucht werden. Die Methode soll eine möglichst vollständige Amplifikation der in der Probe vorliegenden viralen Varianten ermöglichen, um diese anschließend mittels Klonierung und Sequenzierung, auch und gerade unter den komplexen Bedingungen einer HIV-1 Mehrfachinfektion, zu analysieren.

3 Material und Methoden

3.1 Das Mbeya Medical Research Programme (MMRP)

Schon seit mehr als 10 Jahren forscht das *MMRP* an drei der häufigsten Infektionskrankheiten Afrikas – HIV/AIDS, Malaria und Tuberkulose – mit dem Zukunftsziel, die Sicherheit und Effektivität von Impfstoffen und Medikamenten zu evaluieren. Die klinischen Studien finden in der ca. 64.000 km² großen, ländlichen Region Mbeya im Südwesten Tansanias statt, in der ca. 2,5 Mio. Menschen leben. Das *MMRP*, welches momentan ca. 60 tansanische und 10 deutsche Mitarbeiter beschäftigt, arbeitet eng mit den tansanischen Gesundheitsbehörden zusammen und kann so die sofortige, praktische Umsetzung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in der Region gewährleisten. Auch international kollaboriert das *MMRP* mit vielen Instituten, wie z.B. dem Tropeninstitut der LMU München, dem *US Military HIV Research Program*, der *London School of Hygiene & Tropical Medicine* und dem *National Institute for Communicable Diseases in Johannesburg*. Unterstützt wird das Programm u.a. von der Europäischen Kommission, vom *Department for International Development, UK (DIFID)*, von der Friedrich-Baur-Stiftung in München und vom *US Military HIV Research Program* (66).

3.2 Die HIV Superinfection Study (HISIS)

Zwischen September und November 2000 wurde in der Region Mbeya im Südwesten Tansanias im Rahmen des *MMRP* eine offene Kohorte von 600 Frauen, die aufgrund ihrer Arbeit in Bars, Pensionen und Restaurants zu einer HIV-Hochrisikogruppe zählen, für die longitudinale, vierjährige *HISIS*-Studie etabliert. Die Region ist mit anderen Teilen Tansanias sowie mit den Nachbarländern Malawi und Sambia durch internationale Hauptverkehrsstraßen verbunden, entlang derer sich zum größten Teil die Arbeitstätten der Studienteilnehmerinnen befanden. Die Frauen bieten hier meist als „Gelegenheitsprostituierte“ ihre Dienste an, die vor allem von durchreisenden Lastwagenfahrern und Geschäftsleuten in Anspruch genommen werden. Einschlusskriterien waren zum einen ein Alter zwischen 18 und 35 Jahren, und zum

anderen die Präsenz der Frauen im Studiengebiet während der vergangenen 6 Monate. Hauptziel der Studie war die Charakterisierung von HIV-1 Ko- und Superinfektionen und ihre Korrelation mit virologischen, immunologischen und klinischen Einflussgrößen sowie soziologischen Daten. Nachdem ausführlich über die Studie aufgeklärt, wurden die Frauen zum Zeitpunkt der Aufnahme und danach vierteljährlich interviewt, klinisch untersucht und labortechnisch auf HIV und andere sexuell übertragbare Krankheiten hin getestet. Die Untersuchungszeitpunkte werden im Folgenden auch als *Follow ups* bezeichnet. Den Teilnehmerinnen stand eine kostenlose Gesundheitsversorgung offen, welche die Behandlung aller akuten Infektionskrankheiten und sexuell übertragbaren Krankheiten beinhaltete. Außerdem bekamen seit 2003 alle Frauen mit einer CD4+ Zellzahl unter 200 eine Cotrimoxazol – Prophylaxe und wurden seit 2004 einer antiretroviralen Therapie im Rahmen des *Southern Highland Care and Treatment Programme* zugeführt (69, 138).

3.3 Serologische HIV-Antikörper Tests und Gewinnung der PBMCs

Die serologischen HIV-Antikörper Tests sowie die Isolierung und Kryopreservation der PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) aus Vollblut erfolgten in Mbeya, Tansania. Im Folgenden soll das Prinzip dieser Methoden kurz erläutert werden.

3.3.1 Gewinnung der Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie und danach jeweils vierteljährlich. Bei jedem Blutentnahmetermin wurden 4 CPDA-S-Monovetten á 8.5 ml (für die PBMC-Isolation) und eine EDTA-S-Monovette á 2.7 ml (für die serologischen HIV-Antikörper-Tests) befüllt. Alle HIV-Antikörper Tests wurden innerhalb von 7 Tagen nach der Blutentnahme durchgeführt und die Blutproben ggf. bei +4°C bis zur Durchführung des Tests aufbewahrt.

3.3.2 Serologische HIV-spezifische Antikörper Tests

Zur Bestimmung des HIV-Antikörper Status' wurden zwei verschiedene, gegenüber allen bekannten Gruppen von HIV-1 und HIV-2 sensitive ELISAs (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) verwendet. Fiel nur einer der beiden Screening Tests positiv

aus, erfolgte die Bestätigung des Ergebnisses mittels eines hochspezifischen Western Blot Assays, um eventuelle falsch-positive Aussagen auszuschließen. Erst wenn auch dieser Bestätigungstest positiv war, wurde die Probe als HIV positiv klassifiziert.

3.3.2.1 *Enzygnost® Anti-HIV 1/2 Plus, Dade Behring*

Für diesen noch am Tag der Blutentnahme mit einem Probenvolumen von 100µl Blutplasma durchgeführten photometrischen Test werden mit rekombinantem HIV-Antigen beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Das Antigen setzt sich aus den Oberflächenproteinen GP41 (HIV-1) und GP36 (HIV-2) zusammen. Im Plasma enthaltene HIV-Antikörper binden sich an die Oberflächenproteine, ungebundene Plasmabestandteile werden ausgewaschen, und ein Konjugat aus HIV-Antigenen und einer Peroxidase, welches sich wiederum an die auf der Mikrotiterplatte fixierten HIV-Antikörper anlagert, wird zugegeben. Nach Auswaschen des überschüssigen Konjugates und Zugabe des Substrates Chromogen erfolgt die Bestimmung der Enzymaktivität des gebundenen Konjugates mittels einer blauen Farbreaktion. Die enzymatische Umsetzung des Chromogens wird durch den Zusatz von Stopplösung unter Bildung einer gelben Farbe unterbrochen, deren Intensität der in der Probe vorhandenen Antikörperkonzentration proportional ist.

3.3.2.2 *Schnelltest Determine™ HIV 1/2, Abbott*

Für diesen immunochromatographischen Test wurde ein Probenvolumen von 50 µl Blutplasma verwendet. Nachdem das Plasma auf das Probenfeld des Teststreifens gegeben wurde, wandert es durch das Konjugatfeld, wo sich im Plasma befindliche HIV-Antikörper an ein Antigen-Selen Kolloid binden. Dieses Konjugat lagert sich nun im Patientenfenster an dortiges rekombinantes Antigen (GP41, GP36) unter Bildung einer sichtbaren roten Linie an. Enthält die Probe keine HIV-Antikörper kann eine Anlagerung im Patientenfenster nicht erfolgen und die Bildung einer roten Linie bleibt aus. In beiden Fällen läuft ungebundenes Antigen-Selen Kolloid weiter bis zum Kontrollfenster, welches zur Qualitätskontrolle des Teststreifens HIV-1 und HIV-2 Antikörper enthält. Nur wenn auch hier durch die Bindung des Kolloids an die HIV-Antikörper eine sichtbare rote Linie entsteht, ist der Test gültig.

3.3.2.3 HIV Blot 2.2, Genelabs® Diagnostics

Für diesen sehr spezifischen Western Blot werden Nitrozellulose-Streifen, die durch elektrophoretisches Blotting aufgetrennte gebundene HIV-1/2 Antigen-Proteine (u.a. P17, P24, P31, P55, GP41, GP160) enthalten, verwendet. Die Streifen werden mit dem verdünnten Patientenplasma sowie den Kontrollen inkubiert und in der Probe vorliegende HIV-Antikörper binden an die Antigene des Streifens. Diese Antikörper können nach Auswaschen des ungebundenen Materials durch eine Folge von Reaktionen mit an Phosphatase konjugiertem Anti-Human-IgG der Ziege und dem entsprechenden Substrat sichtbar gemacht werden. Auch sehr geringe Mengen HIV-spezifischer Antikörper lassen sich so im Plasma noch nachweisen.

3.3.3 PBMCs: Isolation und Kryopreservation

Die Dichtegradientenzentrifugation nach der Methode von Boyum (17) erlaubt die Abtrennung lebender mononukleärer Zellen (PBMCs) von Erythrozyten und Granulozyten auf der Grundlage ihrer unterschiedlichen Dichten. In Mbeya wurde Histopaque®-1077 (Dichte = $1,077\text{g/cm}^3$), ein Dichtegradientenmedium bestehend aus Polysaccharose (Ficoll™ 400) und Natriumdiatrizoat, verwendet. Auf dieses, in einem Röhrchen vorliegende viskose Polymer, gibt man vorsichtig die mit PBS verdünnten zellulären Bestandteile des Blutes, die vorher durch Zentrifugation vom Plasma abgetrennt wurden. Nach 30minütiger Zentrifugation bilden sich aufgrund der unterschiedlichen Dichten der zellulären Blutbestandteile vier verschiedene Schichten im Röhrchen. Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine höhere Dichte als das Histopaque und bilden daher die unterste Schicht, während sich PBMCs (Monozyten, Lymphozyten) oberhalb des Histopaques in der Interphase ansammeln. Die oberste Schicht bilden die Thrombozyten zusammen mit dem PBS (Bild 10).

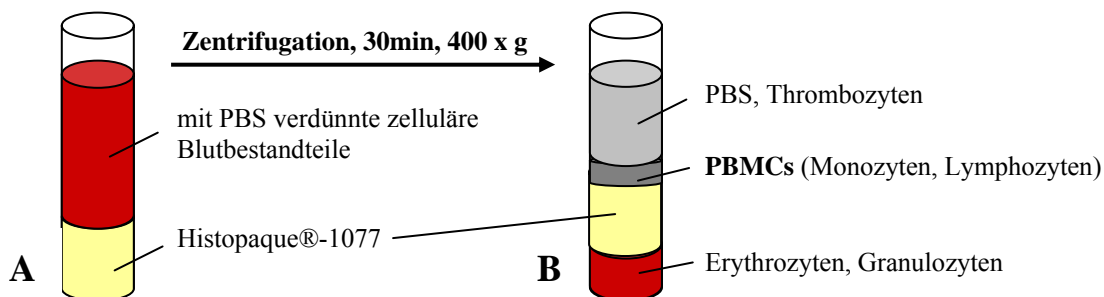


Bild 10. Dichtegradientenzentrifugation A) vor der Zentrifugation, Histopaque überschichtet mit zellulären Blutbestandteilen, B) nach der Zentrifugation, Zellfraktionierung in vier Schichten

Die PBMCs wurden nun abpipettiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit frisch zubereitetem *freezing media*, bestehend aus RPMI 1640, FBS (fetales Rinderserum), DMSO, PenStrep (Penicillin + Streptomycin) und Gentamycin, versetzt. In mehreren Schritten (+4°C → -80°C → -180°C) wurden die Proben dann eingefroren und im flüssigen Stickstoff bei -180°C gelagert.

3.4 Multiregion – Hybridisation – Assay (MHA)

Die Durchführung dieses Assays erfolgte im Tropeninstitut der LMU München. Der MHA wurde von meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Dr. Michael Hölscher zur Genotypisierung von HIV als schnelle und kostengünstige Alternative zur Gesamtgenomsequenzierung entwickelt. Bei dieser Methode soll der HIV-Subtyp in möglichst vielen Genomregionen mittels einer „Echtzeit“ (*real-time*) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Hybridisierungs sonden bestimmt werden (67).

3.4.1 Prinzip der *real-time* PCR

Die *real-time* PCR ist eine der modernsten Methoden zur in vitro Vervielfältigung von DNA. Sie basiert auf dem Grundprinzip der konventionellen PCR, bei der drei Reaktionsschritte (Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Anlagerung der Primer (*Annealing*), Verlängerung der Primersequenz (*Extension*)) zyklisch wiederholt werden und zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz führen. Während sich bei der konventionellen PCR nun ein Schritt zum Nachweis der PCR Produkte (i.d.R. Agarosegelelektrophorese) anschließen muss, finden bei der *real-time* PCR Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß statt.

Schon im Jahre 1992 wurden hierfür die Grundlagen gelegt, indem der PCR-Thermocycler mit UV-Lampe und CCD-Kamera ausgestattet und der PCR-Reaktion etwas Ethidiumbromid zugefügt wurde. Das Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht (62, 63). Auch heute findet diese Methode noch Anwendung, wenngleich mit anderen Farbstoffen (SYBR® Green), die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern. Ein entscheidender Nachteil der Methode ist jedoch ihre mangelnde Spezifität, da sich der Farbstoff an jedes DNA-Molekül bindet, egal ob korrektes PCR-Produkt oder Artefakt.

Zur spezifischen Erfassung des gewünschten Amplikons beruhen daher die heute gängigen Methoden auf der Ausnutzung des *Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers* (FRET), der schon 1948 erstmals beschrieben wurde (24, 42, 99).

3.4.1.1 Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)

Ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) lässt sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und strahlt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Anregungs- und Emissionsspektrum ist dabei für jeden Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch. Befindet sich nun in ausreichender Nähe des einen Fluorochroms (F1) ein zweites Fluorochrom (F2), dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des Ersteren entspricht, wird die von F1 abgegebene Energie direkt an F2 weitergeleitet, der sie als Licht abstrahlt, während F1 nicht fluoresziert. Im Laufe der PCR kann man nun die Lichtstärke des von F1 oder von F2 emittierten Lichtes verfolgen und daran erkennen, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit getrennt sind (Messung des von F1 emittierten Lichtes) oder sich nahe beieinander befinden (Messung des von F2 emittierten Lichtes). F1 wird auch als Reporterfarbstoff und F2 als Quencherfarbstoff bezeichnet.

3.4.2 Prinzip des MHA

Die für den MHA verwendeten fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden (Taqman®-Sonden) sind Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 15 bis 30 Basen, deren 3'-Enden durch eine Phosphatgruppe blockiert sind, damit die Sonden nicht fälschlicherweise als Primer fungieren. Jedes Ende der Taqman®-Sonden trägt ein Fluorochrom. Am 5'-Ende befindet sich der Reporterfarbstoff FAM (6-carboxyfluorescein), während das 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine) markiert ist. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Fluorochrome zueinander kann FRET stattfinden, und der Quencher löscht die Fluoreszenz des Reporters solange die Sonde intakt ist. Während des *Annealing-Schrittes* lagert sich die Taqman®-Sonde spezifisch zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz an. Trifft die Taq-Polymerase während der Neustrang-Synthese in der Extensionsphase auf die hybridisierte Sonde, baut sie diese mit Hilfe ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität Stück für Stück ab, zerstört so die Sonde und unterbricht den FRET zwischen Reporter und Quencher. Die Reporterfluoreszenz wird freigesetzt und

kann gemessen werden (Bild 11). Mit jedem erfolgreichen PCR-Zyklus steigt so das Fluoreszenzsignal an, proportional zur Anzahl der amplifizierten DNA-Stränge. Da die verwendeten Sonden HIV-subtypenspezifisch sind und nur an die Zielsequenz angelagerte Sonden enzymatisch verdaut werden können, wird nur der in der Probe vorliegende Subtyp detektiert.

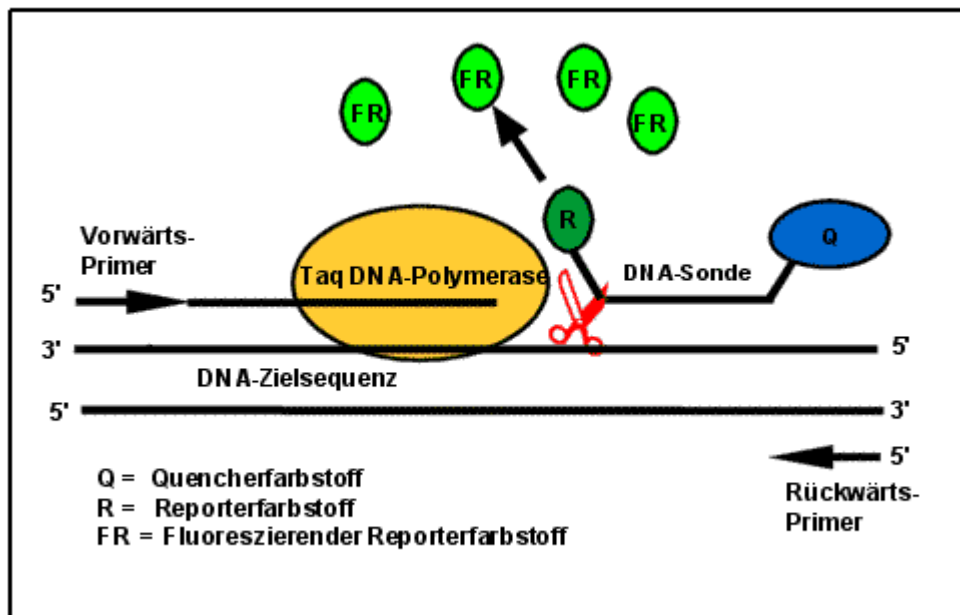


Bild 11. Schema der FRET während der *real-time* PCR. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Hybridisierungssonde enzymatisch verdaut und ein Fluoreszenzsignal freigesetzt (aus: www.bayern.de/lfu/gentec/genlab_meth_taqman.htm)

Für die vorliegende Arbeit wurde der für die in Tansania dominierenden HIV-1 Subtypen A, C und D entwickelte MHA_{ACD} verwendet. Mittlerweile gibt es auch MHA_{BF} , MHA_{BCE} und MHA_{IbnG} , die im nachhinein für andere Regionen konzipiert wurden. Der MHA_{ACD} bestimmt den HIV-1 Subtypen in fünf verschiedenen Genomregionen (*gag*, *pol*, *vpu*, *env* und GP41) mittels einer verschachtelten (*nested*) PCR. Die HIV-DNA wird dazu in diesen fünf Regionen in der ersten konventionellen Runde der PCR amplifiziert, um so die Sensitivität des nachfolgenden Detektionsschrittes zu erhöhen. Anschließend wird das jeweilige Amplikon in drei weiteren PCR-Ansätzen, die je eine der drei subtypenspezifischen Sonden enthalten, vervielfältigt. Diese zweite Runde der *nested* PCR wird in einem *ABI Prism® 7700 sequence detection system* durchgeführt (Bild 12).

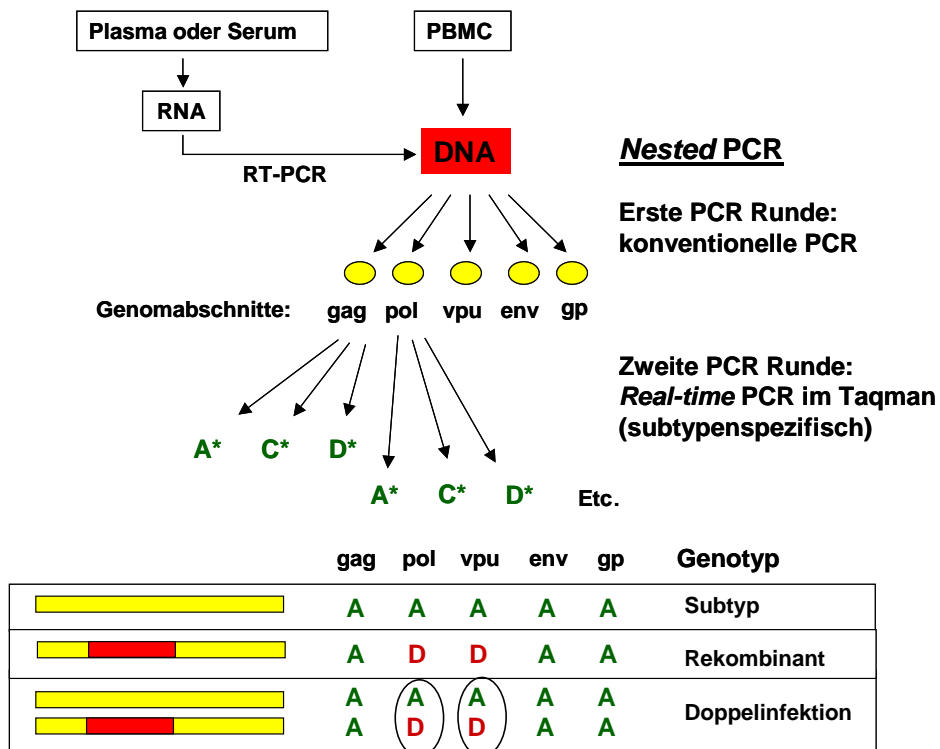


Bild 12. Schema des *Multiregion-Hybridisation-Assay* (MHA_{ACD}). HIV-1 DNA wird in fünf Genomregionen in einer nested PCR amplifiziert. Während der zweiten PCR Runde, der *real-time* PCR, kann in allen fünf Regionen mittels spezifischer Hybridisierungssonden der HIV-1 Subtyp ermittelt werden (adaptiert nach: Hoelscher *et al.*, AIDS 16:2055-2064, 2002)

3.4.3 DNA-Extraktion

Die virale und genomische DNA wurde aus kryokonservierten und in Flüssigstickstoff aufbewahrten PBMC-Proben isoliert. Es wurden 200µl PBMCs verwendet, die noch vom Einfrieren der Probe den potenziellen PCR-Inhibitor DMSO enthielten. Um diesen zu entfernen, wurde vor der eigentlichen Extraktion zweimal mit je 1.3ml PBS pH 7,4 gewaschen und 15min bei 2500U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, und das Pellet mit PBS auf 200µl Probenlösung aufgefüllt. Der zur DNA-Extraktion verwendete *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*® von Roche arbeitet nach dem Prinzip der enzymatischen Zell-Lyse unter Verwendung von Proteinase K. Die Probelösung wurde nach Zugabe von Bindepuffer (Guanidinium-HCl), Proteinase K und poly-(A) RNA im Wasserbad bei 72°C für 10min inkubiert, mit Isopropanol versetzt und in ein *High Pure Filter-Tube* pipettiert. Der Filter besteht aus Glasfaser, welches die DNA in Anwesenheit des chaotropischen Salzes Guanidinium-HCl bindet und sie so von einem

Mix aus Proteinen, Zuckern, Lipiden und anderen in der Lösung vorhandenen Komponenten trennt. Nun schlossen sich mehrere Waschschriffe zur Entfernung von Inhibitoren und Reinigung der gebundenen DNA an. Nach jeder Zugabe eines Waschpuffers wurde 1min bei 8000xg zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Elution erfolgte mit 50µl des bei 70°C vorgewärmten Elutionspuffers (DNAse/RNAse freies Wasser). Die isolierte DNA wurde für weitere Analysen bei -20°C gelagert.

3.4.4 Überführung der DNA in ein 96-well-plate Format

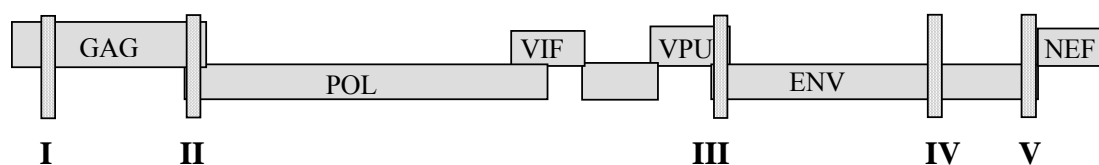
Um einen möglichst hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, wurden je 88 bis 91 extrahierte DNA-Proben plus 5 bis 8 Negativkontrollen (Wasser) in eine 96-well-Platte pipettiert (Bild 13). So konnten bis zu 91 Proben gleichzeitig amplifiziert werden. Dieses Setup wurde dann sowohl für die Erstrunden-, als auch für die Zweitrunden-PCR beibehalten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Negativkontrolle	70-F7	71-F6	72-F6	73-F5	75-F4	76-F4	77-F0	80-F2	81-F2	85-F1	95-F0
B	70-F0	Negativkontrolle	71-F7	72-F7	73-F6	75-F5	76-F5	77-F0	80-F3	81-F3	85-F2	95-F1
C	70-F1	71-F0	72-F0	Negativkontrolle	73-F7	75-F6	76-F6	77-F0	80-F4	81-F4	85-F3	95-F2
D	70-F2	71-F1	72-F1	73-F0	Negativkontrolle	75-F7	76-F7	77-F0	80-F5	81-F5	85-F4	95-F3
E	70-F3	71-F2	72-F2	73-F1	75-F0	76-F0	Negativkontrolle	77-F0	80-F6	81-F6	85-F5	95-F4
F	70-F4	71-F3	72-F3	73-F2	75-F1	76-F1	77-F0	Negativkontrolle	80-F7	81-F7	85-F6	95-F5
G	70-F5	71-F4	72-F4	73-F3	75-F2	76-F2	77-F0	80-F0	81-F0	Negativkontrolle	85-F7	95-F6
H	70-F6	71-F5	72-F5	73-F4	75-F3	76-F3	77-F0	80-F1	81-F1	85-F0	Negativkontrolle	95-F7

Bild 13. Beispiel eines 96-well-Setups mit 88 Proben und 8 Negativkontrollen. F0-F7 bezeichnen die unterschiedlichen Follow Ups. F0 = Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie, F7 = 21 Monate nach Aufnahme

3.4.5 Primer und Taqman®-Sonden

Die PCR Primer sind universell für die drei zu detektierenden Subtypen A, C und D und können diese mit ähnlich guter Effizienz amplifizieren. Die Taqman®-Sonden sind spezifisch für je einen der drei Subtypen. Alle Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe des *Online-Calculators* der Firma Fisher Scientific berechnet. In **Tabelle 3** sind alle Primer und Sonden mit ihren Schmelztemperaturen und ihren Genompositionen bezogen auf das Referenzisolat HXB2 aufgelistet.

Tabelle 3. MHA-Genomregionen mit allen verwendeten Primern und Taqman®-Sonden, ihren Schmelztemperaturen und Genompositionen bezogen auf das Referenzisolat HXB2.

	Sequenzname	5'-3'Sequenzen	HXB2-Position	Tm
I GAG Fragment				
Äußere Primer	MHGAG1	> AGT ATG GGC AAG CAG GGA	891- 908	62°C
	MHGAG2	< CTG CAG CYT CNT CAT TGA TGG	1400-1420	65°C
Innere Primer	MHGAG3	< GGT CAG YCA AAA TTA YCC TAT AG	1170-1192	55°C
	MHGAG4	< GGC TCC TTC TGA TAA TGC TG	1307-1326	61°C
Taqman®-Sonden	GAGsAp	> CAA AAT GCA CAA GGG CAA	1195-1212	63°C
	GAGsCp	> CAG AAT CTC CAA GGG CAA	1195-1212	61°C
	GAGsDp	> CAA AAC CTA CAG GGR CAA ATG	1195-1215	61°C
II POL Fragment				
Äußere Primer	MHPOL1	> TTC AAC TGT GGC AAR GAA GG	1966-1985	64°C
	MHPOL2	< ACT GTA TCA TCT GCT CCT GT	2328-2347	56°C
Innere Primer	MHPOL3	> TTT AGG GAA AAT TTG GCC TTC	2088-2108	63°C
	MHPOL4	< TGC CAA AGA GTG ATT TGA GG	2253-2272	63°C
Taqman®-Sonden	POLsAp	< CCC YCA TCC CAA AGA TCT CTG	2168-2188	65°C
	POLsCp	< TGT CTC CTC GAA CCT GAA GC	2174-2193	65°C
	POLsDp	< TCC TCC CCA AAC CCG AA	2176-2192	67°C
III VPU Fragment				
Äußere Primer	MHVPU1	> CCT ATG GCA GGA AGA AGC GG	5967-5986	68°C
	MHVPU2	< CTT GTG GGT TGG GGT CTG	6454-6471	64°C
Innere Primer	MHVPU3	> GCA GAA GAY AGT GGC AAT GAG	6209-6229	61°C
	MHVPU4	< GGT ACA CAG GCA TGT GTR GCC C	6430-6451	71°C
Taqman®-Sonden	VPUsAlp	< TCC CCA AGA TCA TAG TTC CC	6275-6295	63°C
	VPUsA2p	< TTC CCA GGA TTA TAG TTC CCC	6274-6295	63°C
	VPUsCp	< ATC CAA AAG CCT AAG ATG CC	6276-6296	62°C
	VPUsDp	< CCA AGG AGC ATG ATG CC	6276-6293	63°C
IV ENV Fragment				
Äußere Primer	MHENV1	> ACG CTG ACG GTA CAG GCC AG	7830-7849	68°C
	MHENV2	< CTT GCT CTC CAC CTT CTT CTT C	8424-8445	63°C
Innere Primer	MHENV3	> GGA TCA ACA GCT CCT AGG RAT TTG G	7988-8012	66°C
	MHENV4	< GGT GAR TAT CCC TGC CTA ACT CTA	8342-8365	63°C
Taqman®-Sonden	ENVsAp	< CAY TTG TCC AAT GCC AAT AAG TC	8201-8223	64°C
	ENVsCp	< CCA ACT GTC CAA TGC TAR TAA ATC	8201-8224	62°C
	ENVsDp	< TTG TCA ATT TCT YTT TCC CAC TCC	8111-8134	65°C
V GP41 Fragment				
Äußere Primer	MHGP1	> GAA GAA GAA GGT GGA GAG C	8424-8442	58°C
	MHGP2	< TTC NAA GCC CTG TCT KAT TC	8761-8780	55°C
Innere Primer	MHGP3	> CCT GTG CCT CTT CTG CTA CC	8510-8529	64°C
	MHGP4.1	< CAG CCA GCT ACT RCT ATT GCT	8678-8698	60°C
	MHGP4.2	< CCY TCA GCT ACT RCT ATT GCT	8678-8698	57°C
Taqman®-Sonden	GPAsAp	< CCA GTC TCA ACC CCT TGA GAC	8587-8589	65°C
	GPAsCp	< CTG TAG TCC CCT GAG ACT GCT G	8582-8587	65°C
	GPAsDp	< AGC ACT ATT CTT TAG TTC CTG AAT CCA	8631-8657	65°C

3.4.6 Erste PCR Runde (konventionelle PCR)

Für jede der fünf Genomregionen *gag*, *pol*, *vpu*, *env* und GP41 wurde ein Mastermix mit den entsprechenden äußeren Primern 1 und 2 hergestellt und auf eine 96-well-Platte verteilt (5 Erstrunden PCR Platten pro DNA Platte) (Tabelle 4).

Tabelle 4. Zusammensetzung des Mastermixes für die erste PCR Runde

Komponenten	je Probe (1x)	je Platte ((96+8)x)	Endkonzentration
Wasser	26,5µl	2756µl	
dNTPs	10,0µl	1040µl	0,25mM
10 x Puffer	5,0µl	520µl	1 x
MgCl ₂	3,0µl	312µl	1,5mM
Primer 1	2,5µl	260µl	1µM
Primer 2	2,5µl	260µl	1µM
Taq-Polymerase	0,5µl	52µl	0,05units/µl
Gesamtvolumen	50,0µl	5200µl	

Nach Zugabe von 5µl DNA wurden die PCR Ansätze 10 Minuten bei 95°C initial denaturiert. Die Amplifikation erfolgte in 36 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil: 95°C für 15 Sekunden, 52°C für 45 Sekunden, 72°C für 90 Sekunden. Die abschließende Elongationsphase betrug 10 Minuten bei 72°C.

3.4.7 Zweite PCR Runde (*real-time* PCR)

Für jede 96-well-Platte mit Erstrunden PCR Produkt, also für jede Genomregion, wurden nun drei für die HIV-1 Subtypen A, C und D spezifische *real-time* PCRs angesetzt, wiederum für jeden Subtypen eine Platte. Jeder der drei Ansätze enthielt spezifische Taqman®-Sonden für den jeweiligen Subtyp und die für alle drei Subtypen universellen Primer 3 und 4 für die entsprechende Region (Tabelle 5).

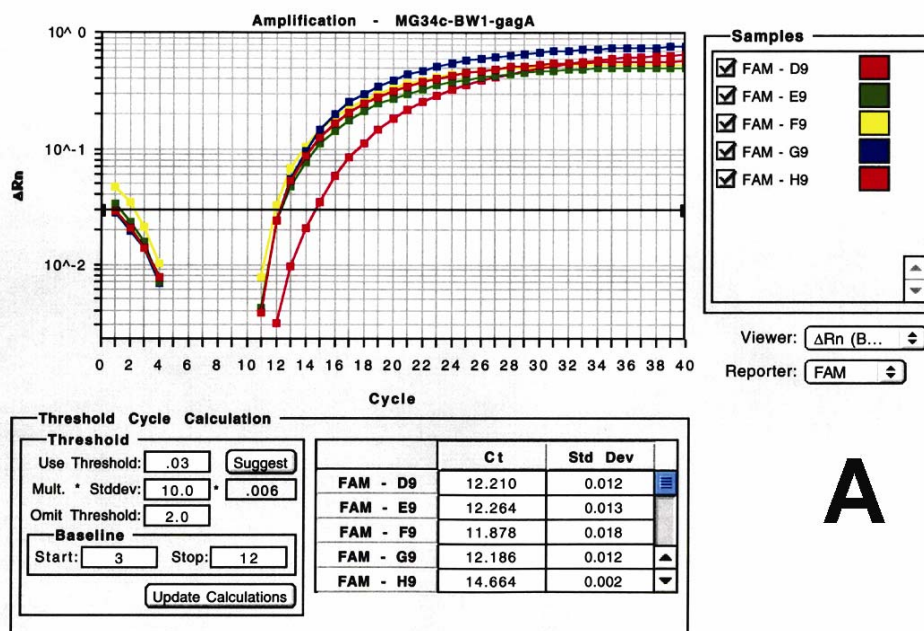
Nach Zugabe von 3µl Erstrunden PCR Produkt wurden die PCR-Ansätze in der 96-well-Platte 2 Minuten auf 50°C erwärmt und dann 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil: 95°C für 15 Sekunden, 55°C für 60 Sekunden und 60°C für ebenfalls 60 Sekunden.

Tabelle 5. Zusammensetzung des Mastermixes für die *real-time* PCR

Komponenten	je Probe (1x)	je Platte ((96+8)x)	Endkonzentration
<i>Universal Mastermix</i>	12,5µl	1300µl	
Primer 3	0,5µl	52µl	0,4µM
Primer 4	0,5µl	52µl	0,4µM
Taqman®-Sonde	1,0µl	104µl	0,2µM
Wasser	10,5µl	1092µl	
Gesamtvolumen	25,0µl	2600µl	

3.4.8 Auswertung

Die Fluoreszenzsignale des Reporters wurden gegen ein Referenzsignal normalisiert (R_n) und das *baseline* Signal subtrahiert (ΔR_n). Man erhielt eine Amplifikationskurve (*amplification plot*), in der ΔR_n linear oder logarithmisch in Abhängigkeit von den PCR Zyklen dargestellt ist (Bild 14). Der Schwellenwert (*threshold*) ergibt sich aus der Standardabweichung der Reporterfluoreszenz der ersten 12 bis 15 auch als *baseline* bezeichneten PCR Zyklen. Als *threshold cycle* (C_T) definiert man den PCR Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet. Als positiv gewertet wurden alle PCR Reaktionen mit einem $C_T < 36$.



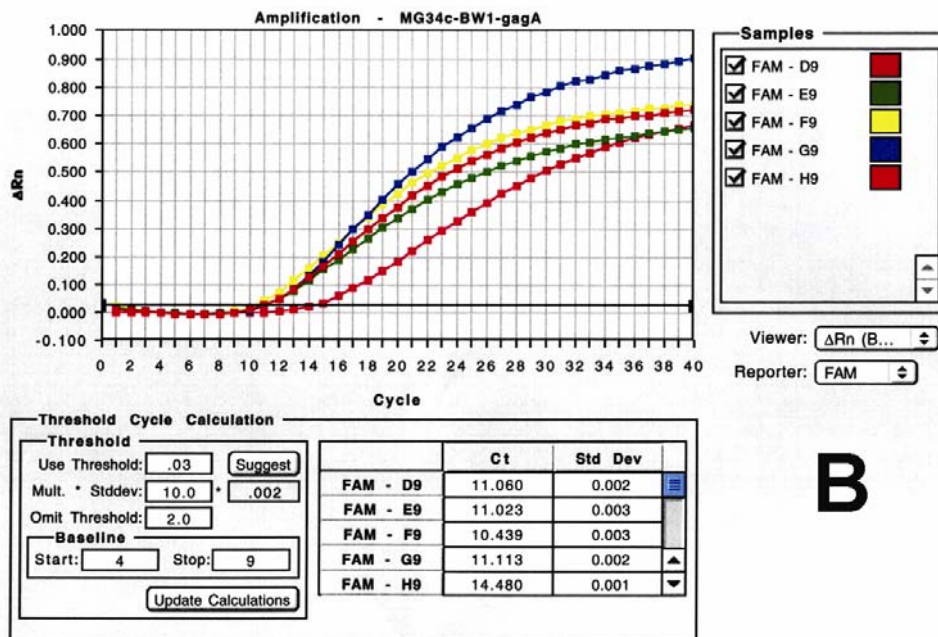


Bild 14. Beispiel einer Amplifikationskurve, ΔRn vs. PCR Zyklus **A** logarithmischer Verlauf, **B** linearer Verlauf

3.4.9 Agarosegelelektrophorese

Die weitere Klassifizierung der Proben, von denen kein Subtyp bestimmt werden konnte, in PCR positiv und PCR negativ erfolgte durch eine Gelelektrophorese.

Das Verfahren dient zur Auftrennung von DNA Fragmenten im elektrischen Gleichstromfeld. Die beim pH Wert des Laufpuffers negativ geladene DNA wird durch das Anlegen einer Spannung zur Anode transportiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist dabei u.a. von ihrer Größe abhängig. Eine Auswertung mit UV-Licht wird durch die Zugabe von Ethidiumbromid ermöglicht, das in die DNA-Doppelhelix interkaliert.

Wenn nicht anderweitig vermerkt, wurden alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen elektrophoretischen Analysen mit folgenden einheitlichen Parametern durchgeführt:

- Gelkonzentration: 2% Seakem LE agarose™
- 2-3 μ l Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) pro 100ml Gel-Lösung
- Laufpuffer: 1x TBE Puffer, Auftragspuffer: 10x Blaupuffer

- Spannung: 80-150V, Laufzeit: 60-120 Minuten (je nach Gel-Größe)
- DNA-Probe: 5-10 μ l, Marker: 100bp Längenstandard, 2 μ g

Alle Proben mit sichtbarem DNA Fragment der richtigen Länge wurden als PCR positiv gewertet, alle anderen als PCR negativ.

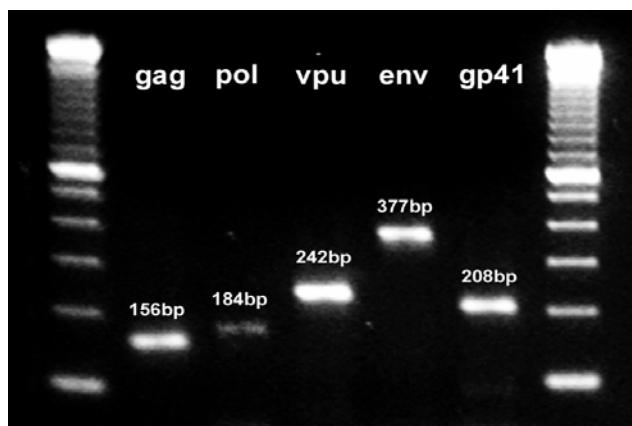


Bild 15. DNA Fragmente für die fünf MHA-Regionen in einem 2%igen Agarosegel mit je 10 μ l PCR Produkt und 2 μ g 100bp Marker

3.5 Longitudinale Analyse der viralen *quasispecies* einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion

Die virale Population einer laut MHA_{ACD} doppelt mit HIV-1 infizierten Studienteilnehmerin wurde zu fünf Zeitpunkten (nach 0, 3, 6, 9 und 12 Monaten) genauer analysiert, bevor sie an den Folgen der Immunschwäche verstarb. Zur Bestätigung der HIV-1 Mehrfachinfektion wurden für jeden Zeitpunkt drei Genomregionen amplifiziert, kloniert und mehrere Klone jeder Region sequenziert.

3.5.1 Bestätigung der Herkunft aller fünf longitudinalen Proben von der selben Person

Die eindeutige Zuordnung der longitudinalen Proben zu einer Person, und damit der Ausschluss potentieller Verwechslungen, erfolgte mit dem PCR Amplifikations Kit *AmpFeSTR Profiler*®. Er basiert auf der Vervielfältigung von *Short Tandem Repeat* (STR) Markern im menschlichen Genom, die in ihrer Länge von Individuum zu Individuum variieren und so in ihrer Gesamtheit eine Art genetischen Fingerabdruck

darstellen (175). Ausgehend von der extrahierten DNA wurden 9 STR Marker und ein Segment des X-Y homologen Gens Amelogenin ko-amplifiziert, wobei jeweils ein Primer eines Marker-spezifischen Primerpaares mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Die Elektrophorese der PCR Produkte zur Auftrennung der Allele nach ihrer Größe und die Fluoreszenzdetektion erfolgten automatisch mit dem *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* im Labor der *Henry M. Jackson Foundation, Rockville, MD, USA*. Mit Hilfe der *GeneScan® Software* konnten die gesammelten Daten analysiert werden.

3.5.2 PCR-Amplifikation mit multiplen Primern

Mittels einer verschachtelten PCR wurden Amplifikate einer Größe zwischen 1,1 und 1,4 kB in Region 1 (*gag/pol*), Region 2 (*vpu/GP120*) und Region 3 (*GP41/nef*) generiert. Region 1 erstreckt sich vom P17 Protein in *gag* bis zum Beginn des *pol*-Gens, Region 2 beginnt innerhalb des *vpu*-Gens und beinhaltet das gesamte GP120-Protein in *env*, und Region 3 umfasst das GP41-Protein und die Hälfte von *nef*. Die drei Genomregionen beinhalten alle fünf MHA Hybridisierungsorte (Bild 16).

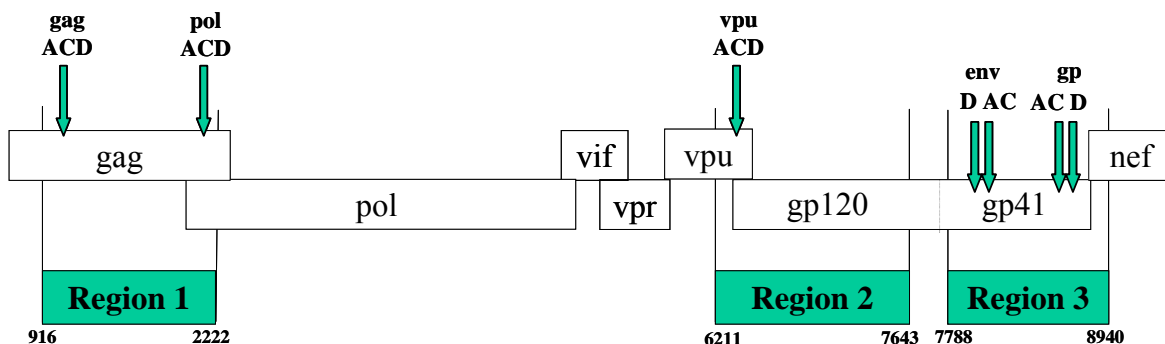


Bild 16. Positionen der MHA-Hybridisierungssonden für die Subtypen A, C und D in den fünf verschiedenen Genomregionen und der drei amplifizierten PCR Regionen (zweite PCR-Runde) Die Zahlen entsprechen den Positionen auf dem HXB2 Referenzisolat.

Um die Sensitivität bei der Erfassung von möglichst vielen viralen Varianten zu erhöhen, wurden in jeder Region für jede PCR Runde zwei Primerpaare eingesetzt. Daraus resultierten in der zweiten PCR Runde vier verschiedene Primerkombinationen, die in vier separaten PCR-Reaktionen Amplikons generierten (Bild 17).

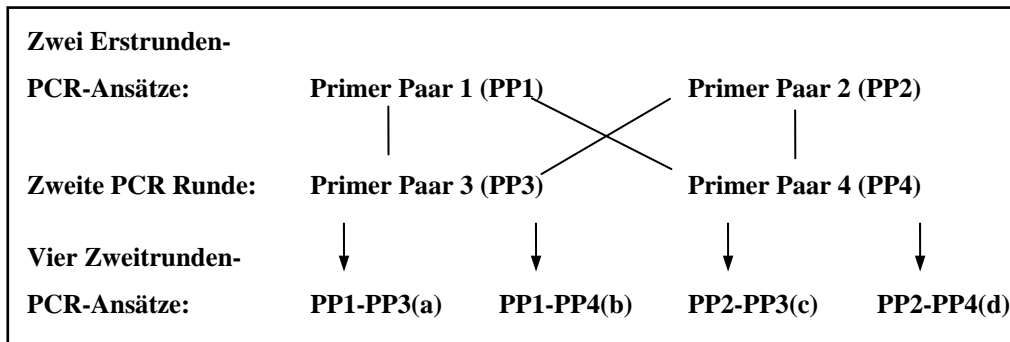


Bild 17. Schema der verschachtelten PCR. Für jede PCR Runde wurden 2 Primerpaare verwendet. Aus ihrer Kombination untereinander resultierten vier Ansätze a, b, c und d für die zweite PCR Runde.

Der Mastermix war für alle drei Regionen und die erste und zweite PCR Runde gleich und beinhaltete 200µM jedes dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 10xPuffer (15mM Tris-HCL pH 8.0 + 50mM KCl), 0.2µM jedes Primers und 3.75 Einheiten Taq-Polymerase. Für die Genomregionen 1 und 2 wurden 5µl und für Region 3 10µl extrahierter DNA zur Erstrunden PCR hinzugefügt. Für die zweite PCR Runde waren 1µl für die Regionen 1 und 3 und 3µl für Region 2 ausreichend. Die PCR Ansätze wurden nun initial für 10 Minuten denaturiert und in 35 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 10 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden zur Anlagerung der Primer bei variierenden Temperaturen (*Annealing*) und 120 Sekunden bei 72°C. Anschließend folgte ein Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten. **Tabelle 6** listet alle verwendeten Primer mit ihrer Genomposition relativ zum Referenzisolat HXB2 und die verwendeten *Annealing* Temperaturen auf. Zum Nachweis der amplifizierten DNA wurde je 5µl PCR Produkt für eine Agarosegelelektrophorese verwendet (Bild 18).

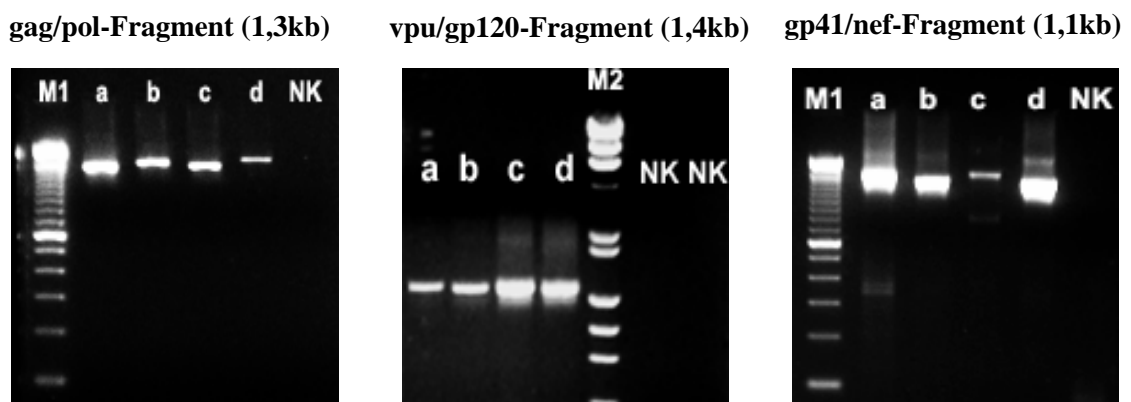


Bild 18. Amplifikationsprodukte der vier Primerkombinationen a, b, c und d in den drei Genomregionen am Beispiel des *Follow up 2* (6 Monate), NK= Negativkontrolle, M1=100bpLeiter, M2=λHindIII/HaeIII

Tabelle 6. Übersicht über alle verwendeten Primer, ihre HXB2-Positionen und der jeweils verwendeten *Annealing*-Temperatur (T_{anneal})

	Primer Name	5'-3' Sequenzen	HXB2 Position	T_{anneal}
(1) gag/pol				
äußeres Primerpaar 1	F2NST (131)	→ GCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGG	769 - 793	58°C
	SP3AS	← CCTCCAATTCCCCTATCATTTTTGG	2382 - 2407	
äußeres Primerpaar 2	MSF12B (131)	→ AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG	623 - 649	58°C
	BJPOL3 (163)	← GTTGACAGGTGTAGGTCCTAC	2481 - 2501	
inneres Primerpaar 1	MHGAG1 (67)	→ AGTATGGGCAAGCAGGGA	891 - 908	55°C
	MHPOL4 (67)	← TGCCAAAGAGTGATTTGAGG	2253 - 2272	
inneres Primerpaar 2	DD	→ GTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAA	892 - 915	55°C
	MHPOL2 (67)	← ACTGTATCATCTGCTCCTGT	2328 - 2347	
(2) vpu/gp120				
äußeres Primerpaar 1	MHVPU1 (67)	→ CCTATGGCAGGAAGAAGCGG	5967 - 5986	52°C
	GP120 (114)	3' ← AGTGCTTCCTGCTGCTCC	7794 - 7811	
äußeres Primerpaar 2	ED3	→ TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG	5957 - 5986	60°C
	AA1570 (6)	← GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCTCC	7794 - 7817	
inneres Primerpaar 1	MHVPU3 (67)	→ GCAGAAGAYAGTGGCAATGAG	6209 - 6229	54°C
	EDS8	← CACTTCTCCAATTGTCCTCA	7648 - 7668	
inneres Primerpaar 2	GP120 (114)	5' → AGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA	6206 - 6228	54°C
	AA1400 (6)	← TTTCTCCTCCAGGTCTGAAG	7625 - 7645	
(3) gp41/nef				
äußeres Primerpaar 1	AES9	→ GAGGACAATTGGAGAAGTG	7649 - 7668	60°C
	JL90	← GTGTGTGGTAGACCCACAGATCAAGGAT	9121 - 9148	
äußeres Primerpaar 2	AES9	→ GAGGACAATTGGAGAAGTG	7649 - 7668	60°C
	JL89 (105)	← TCCAGTCCCCCTTTTCTTTTAAAAA	9064 - 9089	
inneres Primerpaar 1	JL110.ta	→ GGGCAAAGAGAAGAGTGGTG	7723 - 7742	60°C
	JL90	← GTGTGTGGTAGACCCACAGATCAAGGAT	9121 - 9148	
inneres Primerpaar 2	ZKF	→ GTGGGAATAGGAGCTGTTCCTTGGG	7761 - 7787	60°C
	JL88.ta	← GTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG	9013 - 9035	

3.5.3 Klonierung

Die Klonierung wurde mit den Reagenzien und nach dem Protokoll des *TOPO TA Kits for Sequencing, Invitrogen*, durchgeführt.

3.5.3.1 Ligation

Die vier PCR Produkte jeder Region wurden gemischt und direkt in den Vector pCR[®]4-TOPO eingefügt. Dazu wurden 4µl des Mixes mit 1µl Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06M MgCl₂) und 1µl vector 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis gestellt.

3.5.3.2 Transformation

Chemisch kompetente *E.coli* Zellen (One Shot[®] TOPO10), aufbewahrt bei -80°C , wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden $2\mu\text{l}$ des Ligationsansatzes zu den Zellen hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung genau 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erwärmt („Hitzeschock“) und erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von $250\mu\text{l}$ SOC Medium erfolgte eine einstündige Inkubation unter Schütteln bei 37°C . Von dieser Suspension wurde nun ein bestimmtes Volumen (i.d.R. $60\mu\text{l}$ und $120\mu\text{l}$) auf je einer vorgewärmten LB-Kanamycin-Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.4 Selektion rekombinanter Klone und Übernachtskultur

Der hier verwendete Vector pCR[®]4-TOPO enthält das lethale *E.coli* Gen *ccdB* gekoppelt an den C-Terminus des *LacZ α* Fragmentes. Durch Ligation eines PCR Produkts in den Vector wird die Expression des *lacZ α -ccdB* Gens unterbrochen, so dass nur Klone mit aufgenommener Fremd-DNA wachsen können (11-13). Zellen, die nur den reinen Vector enthalten, sterben ab. Zellen, die überhaupt keinen Vector enthalten, sterben ebenfalls, da sie nicht das Gen für Kanamycin-Resistenz enthalten, welches in den Vector integriert ist. Folglich enthält jeder Klon, der auf der Agarplatte gewachsen ist, den rekombinanten Vector.

Von jeder Region und jedem Zeitpunkt wurden mit einer Pipettenspitze oder einem sterilen Zahnstocher zwischen 20 und 30 Kolonien gepickt und in $3,3\text{ml}$ LB Medium mit $50\mu\text{g/ml}$ Kanamycin unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.5 Plasmidextraktion und Enzymverdau

Zweimal nacheinander wurden je $1,5\text{ml}$ der Zellsuspension 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die Extraktion des Plasmids aus dem Zellpellet erfolgte mit Silicagelsäulen des *QIAprep Spin Miniprep Kit*, *Qiagen*, entsprechend dem Arbeitsprotokoll. Eluiert wurde das Plasmid zweimal mit je $40\mu\text{l}$ 10mM Tris-HCl Puffer, pH 8,5. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Der Nachweis des Plasmid-Inserts erfolgte durch Enzymverdau von $3\mu\text{l}$ Eluat mit 8 units

EcoR1 und 10x NEB in einem 20µl Ansatz für 2 Stunden bei 37°C. 10µl des Ansatzes wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (Bild 19).

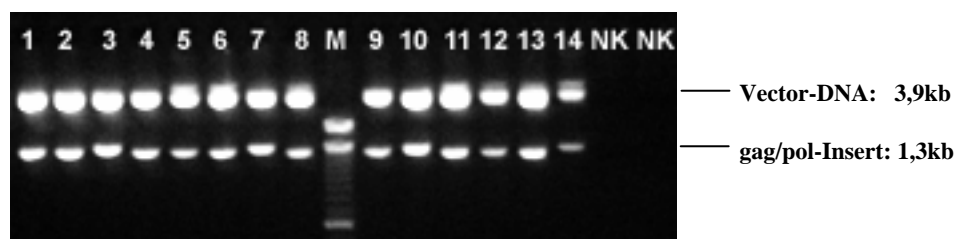


Bild 19. Bsp. eines Enzymverdaus von 14 gag/pol-Plasmiden, M=100bpLeiter, NK=Negativkontrollen

3.5.6 Sequenzierung

Zwischen 17 und 25, das gewünschte DNA-Fragment enthaltende, Klone von jeder Genomregion und jedem *Follow up* wurden sequenziert. Die Sequenzierung und Sequenzanalyse wurden im Labor von Francine McCutchan, *US Military HIV Research Program, Rockville, MD, USA* erlernt und durchgeführt.

3.5.6.1 Das Prinzip

Die HIV-1 DNA der drei Genomregionen, eingefügt in das Plasmid, wurde mit der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger sequenziert (146). Dabei kamen der *Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI* und der *Half Dye[®] SeqSaver, Sigma* zur Anwendung. Beide enthalten Ampli Taq DNA Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) im geeigneten Puffer. Durch Einbau eines ddNTPs erfolgt ein Kettenabbruch, da die Polymerase keine weiteren Nukleotide anhängen kann. Statistisch passiert dies an jeder Position des DNA-Stranges, woraus so viele verschiedene Fragmente resultieren, wie der DNA-Strang Basen enthält. Die Auftrennung dieser unterschiedlich langen DNA-Fragmente erfolgte mittels vollautomatischer Kapillar-Elektrophorese (*ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyser*). Die vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs werden durch Laserstrahlung angeregt und können so detektiert werden.

3.5.6.2 Die Sequenzierungsprimer und Sequenzierungs-PCR

Für jedes der 1,1 bis 1,4 kB langen Fragmente wurden 8-14 Sequenzierungsreaktionen mit unterschiedlichen Primern angesetzt (Tabelle 7), um ein eindeutiges Sequenzierergebnis zu erhalten. Für jede Probe wurden pro Primer 20 µl „Minimastermix“ bestehend aus je 4 µl Big Dye[®] und Half Dye[®], 2-4 µl Plasmid-DNA und Wasser hergestellt, in eine 96-well-Platte pipettiert und 1 µl Primer hinzugefügt. Die Amplifikation erfolgte in 25 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil: 10 Sekunden bei 96°C, 5 Sekunden bei 50°C und 4 Minuten bei 60°C.

Tabelle 7. Liste aller verwendeten Sequenzierprimer mit ihren Sequenzen

Name	5'-3' Sequenz	Name	5'-3' Sequenz
GAG/POL			
DD	GTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAA	HH	ATGAGGAAGCTGCAGAATGGG
JL20	ATTTCTCCCACTGGGATAGGTGG	JL22	TGCACTATAGGGTAATTTTG
LL	TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT	mhgag1	siehe Tabelle 3
mhp04	siehe Tabelle 3	s	GCYGAAGCAATGAGTCAAG
VPU/Gp120			
AAV3	GCCAGTRGTATCAACTCAAYTGC	AES2	YTGCTCTTTCAATATGACCACAG
AES4	CAAGCTTGTGTAATGGCTGAGG	AES5	GCATAGAATGCTTGTCTGGTCC
E15	GTAGAAATTAATTGTACAAGACCC	ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
EDS8	CACTTCTCCAATTGTCCCTCA	JL74	CTGTTCTACCATGTTATTTTTCCACATGT
JL97	CAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG	mhvpu3	siehe Tabelle 3
OFM54	TTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCT	TUE3	TCCTTCTGCTAGACTGCCATTTA
TUA	TATTATGGGGTTCCTGTGTGG	ZIR	AATTTCTAGGTCCCCTCCTGAGGATGG
GP41/NEF			
JL71	TTTTGACCACTTGCCACCCAT	JL88	TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG
JL103	TAACAAATTGGCTGTGGTATATAA	JL106	TTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACT
JL113	TATCAAATGGCTGTGGTATATAA	mhenv2	siehe Tabelle 3
NEF6	AGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAG	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	TU-H	GCCCCAGACTGTGAGTTGCAACAGATG
TU-J	GGTGAGTATCCCTGCCTAAC	ZKF	GTGGGAATAGGAGCTGTGTTCTTGGG

3.5.6.3 Abtrennung überschüssiger Nukleotide

Die Abtrennung der überschüssigen fluoreszenz- und nichtfluoreszenzmarkierten Nukleotide erfolgte mit dem *Centri-Sep 96 well purification plate*, welcher eine spezielle Gelmatrix in Puffer enthält. Nach Entfernen der oberen und unteren Folie wurde der Puffer für 2 Minuten bei 2400 U/min in eine Adapterplatte abzentrifugiert.

Anschließend wurde eine 96-well-Platte unterhalb des *purification plates* befestigt und die gesamten 21µl jeder Sequenzierungsreaktion in je ein *well* des *purification plates* vorsichtig auf die Gelmatrix pipettiert ohne sie dabei zu berühren. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 Minuten bei 2400 U/min, während dessen die Lösung in die 96-well-Platte übergang. Diese wurde dann vom *purification plate* getrennt und ca. 30 Minuten in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Nach Zugabe von 10µl Hi-Di™ Formamid und kurzem Zentrifugieren konnte die Platte im *Genetic Analyser* analysiert werden.

3.5.7 Sequenzanalyse

Die 8-14 Teilsequenzen jeder Probe wurden mit der *ABI Sequencing Analysis software* analysiert und im *Sequencher* Programm zu einem Fragment voller Länge zusammengefügt. Das Alignment der Sequenzen gegen alle HIV-1 Subtypen und die phylogenetische Analyse erfolgten mit MEGA Version 2.1 (97) bzw. den SEQBOOT, DNAPARS, DNADIST, NEIGHBOR und CONSENSE Modulen des PHYLIP Paketes (41) und TREETOOL (107) integriert in die GDE Oberfläche (152).

Distanzmatrices und phylogenetische Stammbäume (erstellt nach der *neighbor-joining* Methode) wurden mit dem Kimura-2-Parameter Modell und einem angenommenen Transition/Transversions-Verhältnis von 2,0 berechnet. Die Überprüfung der resultierenden Topologie des Baumes auf statistische Signifikanz erfolgte nach der Methode des *bootstrapping* (64). Hierbei wird die Reihenfolge der einzelnen Positionen in dem zu Grunde liegenden Sequenzalignment viele Male zufällig verändert und ein neuer Baum berechnet. Genompositionen können dabei auch ganz verschwinden oder mehrfach auftreten. So erhält man eine Vielzahl verschiedener Bäume. Für jeden Sequenzcluster (Baumast, Knoten) wird nun die Häufigkeit berechnet, mit der er in der Gesamtheit aller Bäume auftaucht und als *bootstrap value* bezeichnet. Fände man z. B. einen Ast in 90% aller berechneten Bäume wieder, hätte er ein *bootstrap value* von 90. Werte > 70 gelten als signifikant und die Genauigkeit der Methode steigt mit steigender Anzahl der berechneten Bäume (Wiederholungen). In der vorliegenden Arbeit wurden i.d.R. 500-1000 Wiederholungen durchgeführt.

Zur Identifizierung von Rekombinationsstellen wurde das *bootscanning* nach Salminen (144) und die *informative site analysis (ISA)* software (131) herangezogen. Das

bootscanning gehört zu den sogenannten *sliding-window-scanning* Methoden. Dabei werden die zu untersuchende Sequenz und ein Set von Referenzsequenzen in einzelne um 10-50 Basenpaare überlappende Fragmente (Fenster) von i.d.R. 300 Basenpaaren geteilt. Für jedes Fenster wird anschließend auf der Basis phylogenetischer Übereinstimmung der zu untersuchenden Sequenz mit jeder der Referenzsequenzen ein Maß berechnet und in einem Punktediagramm graphisch dargestellt. Im Falle des *bootscanning* stellt das *bootstrap value* (siehe oben) für einen Knoten, welcher die zu untersuchende Sequenz und die jeweilige Referenz verbindet, dieses Maß dar. Liegt ein rekombinanter Virus vor, wechselt ein hohes *bootstrap value* für den Vergleich mit einer Referenzsequenz sehr schnell zu einem hohen *bootstrap value* für den Vergleich mit einer anderen Referenzsequenz. Der Schnittpunkt beider Kurven gibt die Rekombinationsstelle an.

Die berechneten Rekombinationsstellen wurden anschließend durch den visuellen Vergleich der Sequenzen und durch eine phylogenetische Stammbaumanalyse der entsprechenden Teilregionen bestätigt.

3.6 Evaluierung der PCR-Strategie mit multiplen Primern

Das letzte von der Studienteilnehmerin vor ihrem durch die Immunschwäche verursachten Tod wahrgenommene *Follow up* (nach 12 Monaten) und die *vpu/GP120*-Genomregion wurde für ein separates Experiment ausgewählt. Mit diesem sollte bestimmt werden, ob der Einsatz multipler Primer die Sensitivität bei der Erfassung der Viruspopulation im Vergleich zu einer konventionellen PCR erhöht.

Die Vorgehensweise war die gleiche wie schon unter 3.5 beschrieben mit dem Unterschied, dass nun für diese eine Probe in der Region 2 die vier PCR-Produkte nicht vor dem Klonieren gemischt, sondern separat mit dem MHA_{ACD} auf ihren Subtyp hin untersucht und auch separat kloniert wurden. Von jeder der vier Klonierungen wurden mindestens 20 Klone sequenziert und phylogenetisch analysiert.

3.7 Sequenzeinträge in *Genbank*

Sämtliche in dieser Doktorarbeit beschriebenen HIV-1 Sequenzen können unter folgenden *Genbank accession numbers* eingesehen werden.

Region 1 (gag/pol) AY753734 bis AY753739 und AY753746 bis 753837

Region 2 (vpu/gp120) ... AY821308 bis AY821493

Region 3 (gp41/nef) AY775581 bis AY775676

3.8 Material

3.8.1 Chemikalien

Agarose (Seakem LE)	Biozym, Hess-Oldendorf
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
DNA 100bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (je 100mM)	Qbiogene, Heidelberg
Ethanol, absolut, reinst zur Analyse	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Hi-Di TM Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Half Dye [®] , SeqSaver TM	Sigma, Deisenhofen
Isopropylalkohol, reinst, zur Analyse	AppliChem, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium (Base)	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Oligonukleotide:</u>	
PCR-Primer	Thermo Electron, Ulm
Sequenzier-Primer	Sigma Genosys, The Woodlands, USA

Taqman [®] -Sonden	Applied Biosystems, Darmstadt
PBS pH = 7,4	Gibco, Karlsruhe
10xTAE-Puffer (Tris, Na-Acetat, EDTA)	Roth, Karlsruhe
10xTBE-Puffer (Tris, Borsäure, EDTA)	Roth, Karlsruhe

3.8.2 Enzyme

EcoRI (+ NEB-Puffer)	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNA Polymerase (10xPuffer, MgCl ₂)	Applied Biosystems, Darmstadt

3.8.3 Geräte

ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI PRISM [®] 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav Tecnomara	Integra Biosciences Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Distribiman [®] Pipette	Gilson, Bad Camberg
Gasbrenner GASI	Schütt Labortechnik, Göttingen
<u>Gelelektrophoresekammern:</u>	
DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Horizon 11.14	Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA
GDS8000 [®] , UV-Transilluminator, Gelanalyse- und Dokumentationssystem	UVP Products Ltd., Cambridge, UK
Grabit [®]	
Laminar Flow	Keßler + Luch GmbH, Giessen

Magnetrührer	IKA® Werke, Staufen
Mehrkanalpipetten Impact, 12µl und 30µl	Matrix Technologies, Wilmslow, UK
Mikrowelle Privileg 8017E	Quelle, Fürth
Pipetman® Pipetten	Gilson, Bad Camberg
<u>PCR-Maschinen:</u>	
Personal Cycler	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen
Uno II	Biometra, Göttingen
Schüttler Titertek®	Flow Laboratories
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Waage Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen
Wasserbad	Haake, Berlin
<u>Zentrifugen:</u>	
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 46	Hettich, Tuttlingen

3.8.4 Kommerzielle Kits

AmpFeSTR Profiler® Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Big Dye® Terminator v 3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

3.8.5 Sonstiges

(Agar)platten (d=90mm), steril	Roth, Karlsruhe
Drigalski Spatel	Roth, Karlsruhe
Glasflaschen 250ml, 500ml	Schott AG, Mainz
Kulturröhrchen, steril	Roth, Karlsruhe
Micro Amp [®] , 96-well-Platten + Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Kisker, Steinfurt
Zentrifugierröhrchen, 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg

4 Ergebnisse

4.1 Anwendung des MHA zu Subtypenuntersuchungen in einer Hochrisiko- Population (HISIS Studie)

Zwischen September und November 2000 wurden 600 Barfrauen an ihren Arbeitsstätten entlang des Transafrikanischen Highways für die vierjährige HISIS-Studie, durchgeführt in Mbeya, Tansania, rekrutiert. 407 Teilnehmerinnen waren zum Zeitpunkt ihres Eintritts in die Studie HIV-1 positiv, was einer HIV-1 Prävalenz von 67,8% entspricht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 75 HIV-1 positive Barfrauen zu Beginn der Studie und danach vierteljährlich auf ihren HIV-1 Subtyp hin untersucht. Bei 31 der Frauen erfolgte die Subtypenbestimmung zu 8 verschiedenen Zeitpunkten, also zu Beginn und nach 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 Monaten (*Follow ups* F0 bis F7). Die anderen 44 Teilnehmerinnen verstarben innerhalb der ersten 21 Monate, 36 an den Folgen von AIDS und 8 aus anderen, nicht mit der Immunschwäche in Zusammenhang stehenden Gründen wie Unfall oder Komplikationen während der Schwangerschaft. Die Einteilung der 36 Frauen in die Gruppe der an AIDS Verstorbenen (= Gruppe A) basierte auf der sogenannten *verbal autopsy* und auf vorhandenen klinischen Daten. Mindestens zwei der von der WHO vorgegebenen Merkmale für die Diagnose von klinischem AIDS in Afrika mussten im Laufe des Untersuchungszeitraums erfüllt werden. Die zweite Gruppe (Gruppe P) bildeten alle 31 nach 21 Monaten noch lebenden Teilnehmerinnen und die restlichen 8 Verstorbenen, also insgesamt 39 Frauen.

Angewendet zur Genotypisierung wurde der vor einigen Jahren von Dr. M. Hölscher entwickelte sogenannte *Multiregion-Hybridisierungs-Assay* (MHA_{ACD}) (67), der so erstmals im Rahmen einer größeren Studie zum Einsatz kam. Diese *real-time* PCR Methode kann mit Hilfe von subtypenspezifischen, fluoreszenzmarkierten Taqman®-Sonden zwischen den in Tansania verbreiteten HIV-1 Subtypen A, C und D in fünf verschiedenen Genomabschnitten differenzieren und ermöglicht so auch die Detektion von rekombinanten Viren und Mehrfachinfektionen.

4.1.1 MHA Performance innerhalb der HISIS Studie

4.1.1.1 MHA Performance insgesamt

Von 75 Proben wurde in 5 Genomregionen und an bis zu 8 Zeitpunkten der HIV-1 Subtyp bestimmt. Insgesamt wurden 2130 PCR Reaktionen durchgeführt, von denen 1826 (85,7%) positiv waren. Bei Betrachtung der einzelnen Genomregionen liegt der Anteil positiver PCRs zwischen knapp 67% in der *env*-Region und 96% in der GP-Region. Bei 1492 PCR Reaktionen konnte aufgrund eines positiven Sonden-Signals der HIV-1 Subtyp bestimmt werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 70,0%. Diese vergleichsweise niedrige durchschnittliche Sensitivität ist vor allem auf eine schlechte Performance des MHA in der *env*-Region zurückzuführen. Die Sensitivität lag hier nur bei knapp 47%. In der *gag*- und GP41-Region dagegen hat sowohl die Hybridisierung der Primer und damit die PCR als auch die Hybridisierung der Sonden sehr gut funktioniert, was sich in einer Sensitivität von knapp 79% bzw. 88% wieder spiegelt (Tabelle 8).

4.1.1.2 Vergleich der MHA Performance in Gruppe A (an AIDS Verstorbene) und Gruppe P (Prevalente)

Die Sensitivität des MHA liegt bei Gruppe A mit 78,9% um 14% höher als bei Gruppe P mit nur 64,9%. Die höhere Sensitivität in Gruppe A ist bedingt durch einen höheren Anteil positiver PCR-Amplifikate (95,4% versus 80,1%), während die Hybridisierungsrate der Sonden in beiden Gruppen annähernd gleich ist. In der Gruppe A liegt der Anteil positiver PCR-Reaktionen in allen MHA-Regionen relativ konstant bei grösser 90%; in Gruppe P schwankt er dagegen von Region zu Region zwischen 52,8% in *env* und 94,4% in *gag*. (Tabelle 9).

Tabelle 8. Sensitivität des MHA für alle untersuchten Patientenproben

	alle Reg.	GAG	POL	VPU	ENV	GP
PCRs total	2130	426	426	426	426	426
PCR + (absolut) *	1826	408	364	360	285	409
PCR + (prozentual)*	85,7%	95,8%	85,4%	84,5%	66,9%	96,0%
Taqman[®]-Sonde +**	1492	336	278	304	200	374
Sonden-Hybridisierung***	81,7%	82,4%	76,4%	84,4%	70,2%	91,4%
Sensitivität****	70,0%	78,9%	65,3%	71,4%	46,9%	87,8%

Tabelle 9. Vergleich der Sensitivität des MHA für Patientenproben der Gruppen A und P

	alle Reg.		GAG		POL		VPU		ENV		GP	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
PCRs total	785	1345	157	269	157	269	157	269	157	269	157	269
PCR +*	749	1077	154	254	145	219	151	209	143	142	156	253
PCR + (prozentual)*	95,4%	80,1%	98,1%	94,4%	92,4%	81,4%	96,2%	77,7%	91,1%	52,8%	99,4%	94,1%
Taqman[®]-Sonde +**	619	873	123	213	124	154	139	165	98	102	135	239
Sonden-Hybridisierung***	82,6%	81,1%	79,9%	83,9%	85,5%	70,3%	92,1%	78,9%	68,5%	71,8%	86,5%	94,5%
Sensitivität****	78,9%	64,9%	78,3%	79,2%	79,0%	57,2%	88,5%	61,3%	62,4%	37,9%	86,0%	88,8%

* alle PCR Reaktionen mit im Agarosegel sichtbaren DNA Banden der richtigen Fragmentlänge

** Anzahl der Reaktionen mit positivem Fluoreszenzsignal, d.h. das Fluoreszenzsignal muß bis zum PCR-Zyklus 36 den Schwellenwert durchbrochen haben

*** Anzahl der Reaktionen mit positivem Fluoreszenzsignal dividiert durch Anzahl der positiven PCR Reaktionen

**** Anzahl der Reaktionen mit positivem Fluoreszenzsignal dividiert durch Anzahl der gesamten PCR Reaktionen

4.1.2 HIV-1 Subtypenverteilung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie (Follow Up 0)

4.1.2.1 Subtypenverteilung insgesamt

Von 75 untersuchten Patientenproben konnten zum Zeitpunkt F0 bei 65 mehr als zwei der fünf MHA-Regionen amplifiziert und subtypisiert werden. Von den reinen HIV-1 Subtypen war C mit 22/65 (34%) am häufigsten, gefolgt von Subtyp A mit 6/65 (9%) und Subtyp D mit 3/65 (5%). Rekombinationen zwischen mindestens zwei verschiedenen Subtypen wurden bei 21/65 (32%) der Teilnehmerinnen festgestellt. Davon fallen mehr als die Hälfte, nämlich 12/21 (57%), auf AC-Rekombinante, 4/21 (19%) auf CD, 3/21 (14%) auf ACD und 2/21 (10%) auf AD. 13/65 (20%) waren schon bei Aufnahme in die Studie mit mehr als einem HIV-1 Subtypen infiziert (Bild 20).

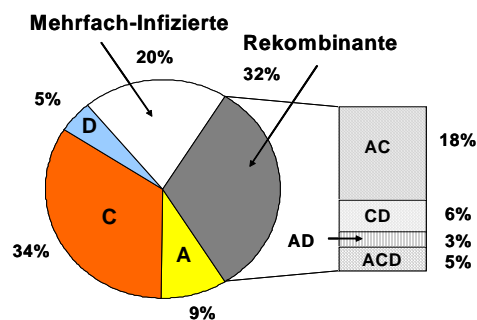


Bild 20. Subtypenverteilung in der Hochrisikokohorte (n=65)

4.1.2.2 Vergleich der Subtypenverteilung in Gruppe A und Gruppe P zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie (F0)

Gruppe A (an AIDS Verstorbene):

Bei 33 der 36 Proben konnte in mindestens drei Genomregionen der Subtyp bestimmt werden. Von diesen 33 Isolaten waren 10 (30%), also fast ein Drittel, mit mehr als einem HIV-1 Subtypen infiziert. Weiterhin wurden 10/33 (31%) Rekombinante, 8/33 (24%) Subtyp C, 3/33 (9%) Subtyp A und 2/33 (6%) Subtyp D identifiziert (Bild 21 A).

Gruppe P (Prevalente):

Bei 32 der 39 Proben konnte in mindestens drei Genomregionen der Subtyp bestimmt werden. Von diesen 32 Isolaten waren nur 3 (9%) mehrfach infiziert und 11/32 (34%) rekombinant. Von den reinen Subtypen war C mit 14/32 (45%) am häufigsten, gefolgt von A mit 3/32 (9%) und D mit 1/32 (3%) (Bild 21 B).

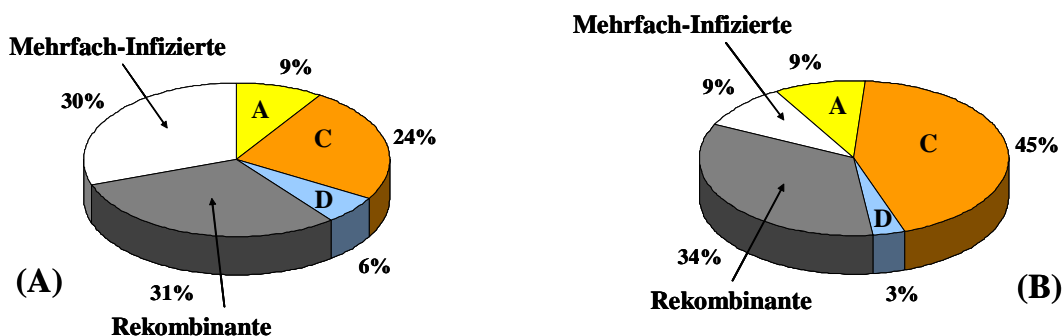


Bild 21. (A) Subtypenverteilung in der Gruppe A (n=33), (B) Subtypenverteilung in der Gruppe P (n=32)

Auffällig ist die signifikant höhere Anzahl von Mehrfachinfektionen in der Gruppe der an AIDS Verstorbenen im Vergleich zu den Frauen, die sich in einem noch nicht so weit fortgeschrittenen Infektionsstadium befinden ($\chi^2=4,45$; $p=0.035$).

4.1.3 Subtypenmuster der einzelnen Rekombinanten

In **Tabelle 10** sind die MHA-Subtypisierungsmuster für alle 21 zu Beginn der Studie (F0) identifizierten rekombinanten Isolate zusammengefasst.

Tabelle 10. Subtypenmuster der rekombinanten Isolate basierend auf den MHA-Ergebnissen zum Zeitpunkt F0. Mehrfachinfektionen wurden nicht berücksichtigt. Verschiedene Rekombinationsmuster sind nummeriert von 1 bis 13. Bei drei Isolaten ist mit den vorhandenen Informationen keine eindeutige Zuordnung zu einem Rekombinationsmuster möglich. Rekombinationsmuster mit fettgedruckten Muster-Nummern kommen bei mindestens drei Isolaten vor. „PCR +“ steht für ein Amplikon, welches nicht subtypisiert werden konnte; ein Minus steht für eine negative PCR-Reaktion.

Isolat	gag	pol	vpu	env	gp	Muster-Nr.
403	A	C	C	A	D	1
476	A	A	PCR +	D	D	2
340	A	C	-	A	C	3
005	PCR +	C	C	A	C	3, 8
317	A	-	C	PCR +	C	3, 4, 11
223	A	A	C	A	PCR +	4
285	A	A	C	PCR +	PCR +	2, 4
072	A	A	PCR +	C	A	5
071	C	PCR +	C	C	A	6
372	C	C	C	PCR +	A	6
203	C	C	C	C	D	7
239	C	C	C	A	C	8
020	C	C	C	A	C	8
007	C	C	PCR +	A	C	8
341	C	C	PCR +	A	C	8
487	C	D	C	A	C	9
408	D	C	C	C	C	10
632	PCR +	C	C	D	C	11
058	D	D	C	A	D	12
676	PCR +	D	C	PCR +	D	12
516	D	D	D	A	D	13

4.1.4 Nähere Betrachtung der Mehrfachinfektionen

Basierend auf den MHA-Ergebnissen wurden zu Beginn der Studie (Follow Up 0) insgesamt 13 Mehrfachinfektionen (alle ausnahmslos Doppelinfektionen) detektiert. C war als reiner Subtyp insgesamt fünfmal (Isolate 073, 077, 328, 509, 620) beteiligt, Subtyp A zweimal (Isolate 507, 633). Ob im Falle der Isolate 127 und 503 reine Subtypen beteiligt waren, kann nicht eindeutig geklärt werden. Mit mindestens einem Strang pro Isolat machen die rekombinanten Viren über 50% aller Beteiligten an den Doppelinfektionen aus.

Tabelle 11. Isolate mit Hinweis auf Doppelinfektion zu Beginn der Studie (F0) basierend auf den MHA-Ergebnissen. Bei einigen Isolaten konnte in ein oder zwei Regionen kein Subtyp ermittelt werden (leere Felder).

Isolat	GAG	POL	VPU	ENV	GP
073	C		C	A, C	C
077	C		C		C, D
127	A, D		A, D	D	D
129	C	C	C, D	C	D
236	C			A	A, C
328	C	C	C, D		C
503	C	C	C, D	C, D	A, C
507	A	A	A, C		A
509	C		C	A, C	C
535	A	A	C	A, C	A
539	A	A, C	C	A, D	D
620	C	C	C	C	C, D
633		A, C		A	A

4.1.5 Longitudinale Untersuchung der Hochrisikokohorte

Wurden alle mittels MHA_{ACD} untersuchten Zeitpunkte in die Analyse mit einbezogen, nahm die Komplexität der Isolate im Vergleich zur Basisuntersuchung zum Zeitpunkt F0 bei 13 (20%) der Studienteilnehmerinnen zu. Zur bestehenden HIV-1 Infektion kam also noch eine Superinfektion mit einem anderen HIV-1 Subtyp dazu. Daher stieg im Verlauf der Studie die Anzahl der Mehrfachinfektionen von 13/65 auf 26/65 genau auf das Doppelte an. Dabei stieg die Komplexität bei den an AIDS Verstorbenen in gleichem Maße an wie bei den restlichen Prevalenten. Lag zu Beginn der Studie schon eine Doppelinfektion vor, kam es nur in einem Fall zu einer weiteren Superinfektion bei einer Studienteilnehmerin, die kurz darauf an den Folgen von AIDS verstarb. Waren die Frauen mit Subtyp D oder mit einem den Subtyp D enthaltenden rekombinanten Virus infiziert, kam es gar nicht bzw. nur einmal zu einer Superinfektion (Tabelle 12).

Tabelle 12. Anstieg der Komplexität der Isolate innerhalb von 21 Monaten nach Aufnahme in die Studie in Abhängigkeit des Subtyps zum Zeitpunkt F0

Subtyp zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie (F0)	A	C	D	Rekombinante	Doppelinfektion
Anzahl von Superinfektionen innerhalb von 21 Monaten / Anzahl der Proben zum Zeitpunkt F0	2 / 6 (33,3%)	5 / 22 (22,7%)	0 / 3	5 / 21 (23,8%)	1 / 13 (7,7%)

AC	AD	CD	ACD
4 / 12 (25,0%)	0 / 2	0 / 4	1 / 3 (33,3%)

4.2 Longitudinale Analyse der viralen *quasispecies* einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion

Unter den, mit Hilfe des MHA_{ACD} identifizierten, potenziellen HIV-1 Doppelinfektionen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Fall ausgewählt und mittels Klonierung und Sequenzierung bestätigt. Die Teilnehmerin war zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie gesund und berichtete nach 6 bzw. 9 Monaten über kurze Fieber- und Durchfallepisoden. 12 Monate nach der Basisuntersuchung wirkte sie schon sehr schwach und wies Symptome des Vollbildes von AIDS, wie körperlichen Verfall, chronisches Fieber und chronischen Husten, auf. Nachdem die Patientin zur folgenden Untersuchung nach weiteren 3 Monaten nicht erschien, wurden im Rahmen einer *verbal autopsy* die Angehörigen befragt und bestätigten den Tod der Studienteilnehmerin durch eine opportunistische Infektion. Die Subtypisierung mittels MHA_{ACD} ergab eine Doppelinfektion mit Subtyp A und C in der *vpu*-Region. Interessanterweise konnte keiner der beiden Subtypen konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum detektiert werden (Tabelle 13).

Tabelle 13. Ergebnisse der Subtypisierung der Studienteilnehmerin 507 mittels MHA_{ACD}

Region	gag	pol	vpu	env	gp
F0 (<i>baseline</i>)	A	A	A, C	pcr +*	A
F1 (3 Monate)	A	A	C	A	A
F2 (6 Monate)	A	A	A, C	pcr +*	A
F3 (9 Monate)	A	A	A	pcr +*	A
F4 (12 Monate)	A	A	A, C	pcr +*	A

*Trotz vorhandenem Amplifikat konnte kein Subtyp bestimmt werden.

4.2.1 PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung in drei Genomregionen

Zur Bestätigung der Doppelinfektion dieser Studienteilnehmerin mit den Subtypen A und C, wurden von jedem der 5 Zeitpunkte drei zwischen 1,1 und 1,4 kB lange Genomfragmente amplifiziert, die alle 5 MHA-Genomregionen beinhalteten. Unter Verwendung von je zwei äußeren und zwei inneren Primerpaaren wurden für jede

Region vier PCR Produkte erhalten, die mit den vier verschiedenen Primerkombinationen generiert wurden. Nach dem Mischen und Klonieren der vier Amplifikate jeder Probe, wurden je Probe ca. 20-30 Kolonien gepickt, über Nacht in LB-Medium kultiviert und einer Plasmidextraktion unterzogen. Anhand des anschließenden Enzymverdaus wurden die Plasmide, welche die Zielsequenz enthielten, ausgewählt und sequenziert. Insgesamt wurden 298 Klone, 17 bis 25 je Region und Zeitpunkt, sequenziert und analysiert.

4.2.2 Phylogenetische Analyse der Sequenzen

Die phylogenetische Analyse enthüllte eine Fülle von unterschiedlichen Virussträngen in allen drei Genomregionen inklusive einiger rekombinanter Formen.

4.2.2.1 Region 1 (*gag/pol*)

Es wurden insgesamt 98 Sequenzen, in etwa die gleiche Anzahl für jeden Analysezeitpunkt, in dieser Genomregion in die Analyse einbezogen. Drei unterschiedliche molekulare Formen konnten identifiziert werden, ein Subtyp A (Form I) und zwei verschiedene AC Rekombinante (Formen II und III) (Bild 22).

Die, dem Subtyp A entsprechenden, Teilstücke stimmten in allen drei Virussträngen überein, was den Schluss zulässt, dass das A-Isolat einen der Elternformen der beiden rekombinanten Formen darstellt. Auch die, dem Subtyp C entsprechenden, Teilstücke der beiden rekombinanten Formen sind identisch, stammen also von dem gleichen Mutterisolat ab, welches allerdings nicht detektiert werden konnte.

Die Abstammung der beiden Rekombinanten von den gleichen Elternsträngen wird belegt durch eindeutiges Clustern der A-Stücke bzw. der C-Stücke miteinander in den Stammbäumen der Teilregionen und durch die Analyse der Distanzen zwischen den Sequenzen in den Teilregionen. Die Distanzanalyse ergab in den längeren Teilabschnitten Werte von kleiner 3% und in dem sehr kurzen Genomstück von nur 86 Basenpaaren einen Wert von 4.1% (Bild 23).

Die rekombinante Form II war mit 60% aller Sequenzen die vorherrschende Virusvariante, gefolgt von Form I (Subtyp A) mit 34%. Form III wurde mit 6% aller Sequenzen nur selten und nur zu zwei Zeitpunkten detektiert.

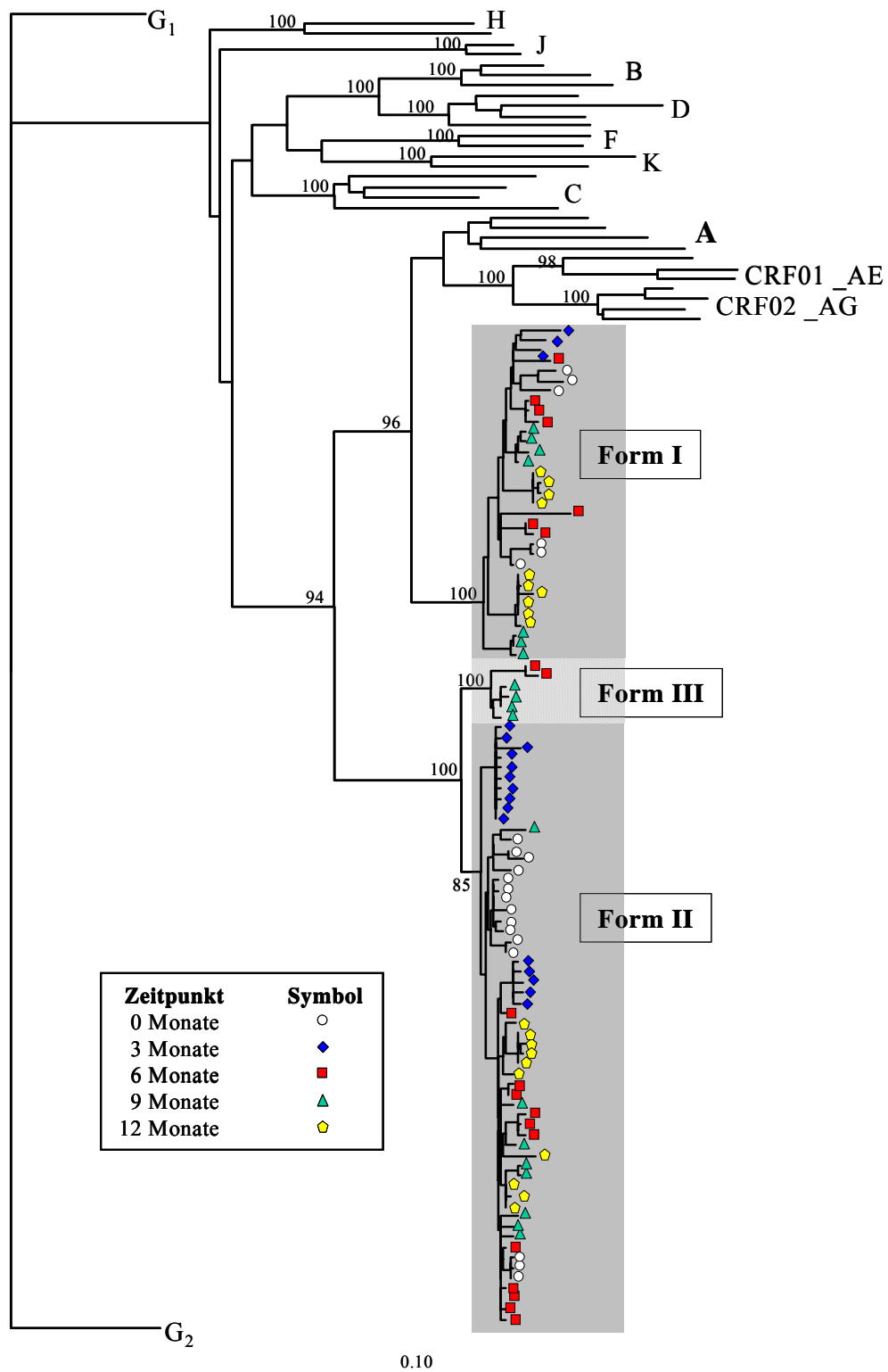


Bild 22. Phylogenetischer Stammbaum der Region 1 (*gag/pol*) mit 98 Nukleotidsequenzen der fünf aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte. Zahlen an den Knotenpunkten geben die signifikanten bootstrap values größer als 70% an.

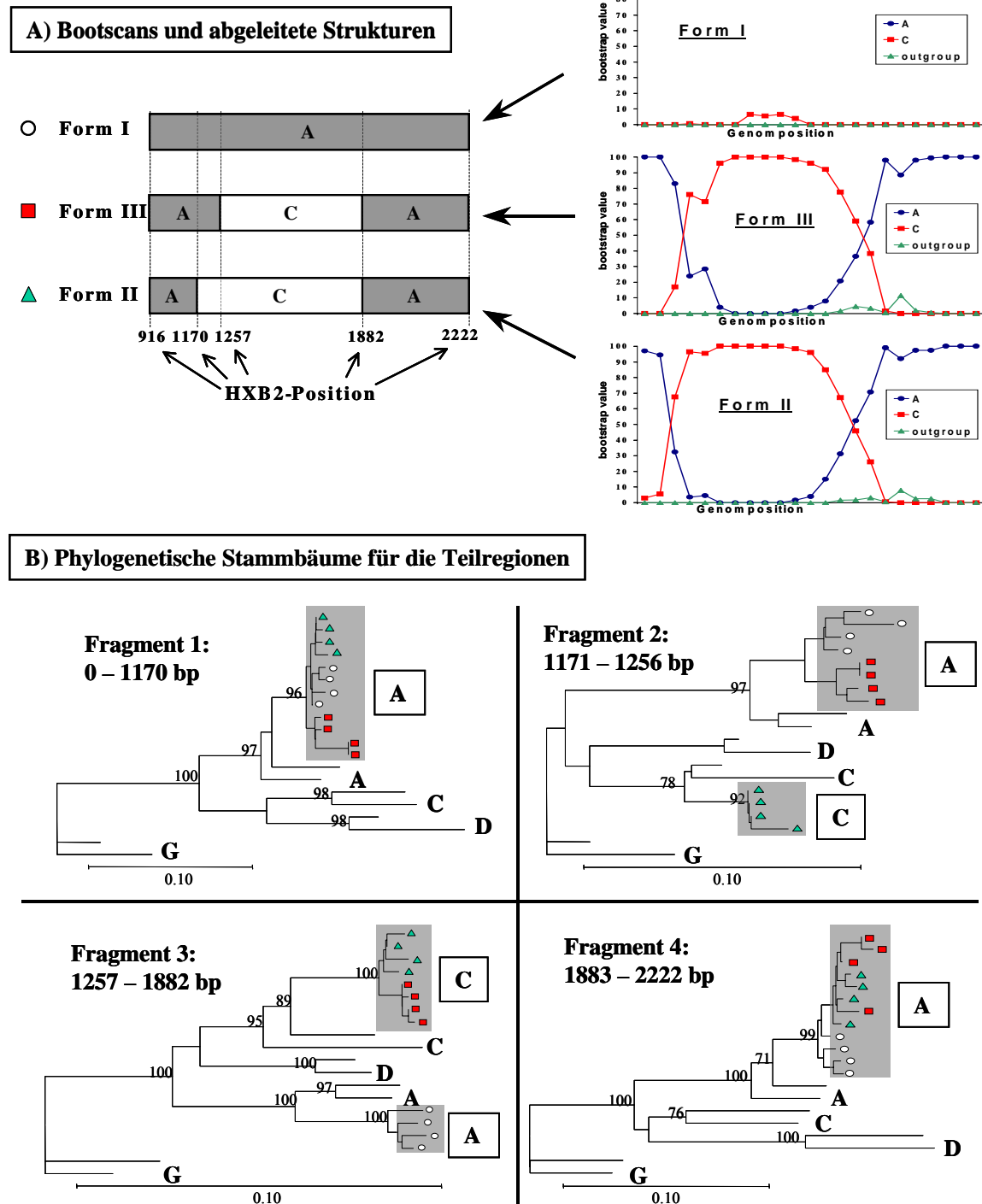


Bild 23. A) Von den *bootscans* abgeleitete Strukturen der drei identifizierten molekularen Formen in Region 1 (*gag/pol*). B) Phylogenetische Stammbäume mit vier Sequenzen je molekularer Form für die jeweiligen Teilregionen zwischen den Rekombinationspunkten. Formen I, II und III *clustern* unterschiedlich in Abhängigkeit ihrer Subtypen in den unterschiedlichen Teilregionen. Die Großbuchstaben neben den Sequenz-*Clustern* bezeichnen den HIV-1 Subtypen.

4.2.2.2 Region 2 (*vpu/GP120*)

Bild 24 zeigt die virale Diversität in *vpu/GP120*. Unter den 104 untersuchten Sequenzen konnten mindestens acht verschiedene Formen identifiziert werden. Damit ist *vpu/GP120* die Heterogenste der analysierten Genomregionen.

Die Patientin war anscheinend mit drei unterschiedlichen HIV-1 Formen infiziert, aus denen sich verschiedene rekombinante Viren bildeten. Die drei Elternformen wurden identifiziert als Subtyp C (Form I) und zwei voneinander verschiedene Subtypen A, die im Folgenden als A₁ (Form II) und A₂ (Form III) bezeichnet werden sollen (Bild 25). Beide stammen vom Subsubtypen A1 ab. Die mittlere genetische Distanz von 9,2% zwischen beiden A-Formen im Vergleich zur Distanz der Sequenzen innerhalb jeder der Formen von nur rund 2% bestätigt das Vorliegen zweier unterschiedlicher Varianten des Subtyps A. Dennoch ist der genetische Unterschied zwischen den beiden A-Formen geringer als der zwischen diesen und den Referenzsequenzen des Subtyps A (rund 15%). Dies ist höchstwahrscheinlich die Folge von kleineren Rekombinationsereignissen zwischen den beiden A-Formen im infizierten Organismus nach der Infektion.

Weiterhin wurden vier Intersubtyp-Rekombinante identifiziert, Form IV und V gebildet aus den Subtypen A₁ und C und Form VI und VII aus den Subtypen A₂ und C. Jeder der Rekombinanten entstand durch ein einziges Rekombinationsereignis zwischen den entsprechenden Elternformen, wie durch die Berechnung von Stammbäumen der Teilregionen mit hohen *bootstrap*-Werten (Bild 26, Bild 27) bestätigt werden konnte.

In der Form VIII wurden fünf A₁A₂-Rekombinante mit verschiedenen Rekombinationsmustern zusammengefasst, die in **Bild 28** und **Bild 29** dargestellt sind.

Phylogenetischer Stammbaum für Region 2 (vpu/gp120)

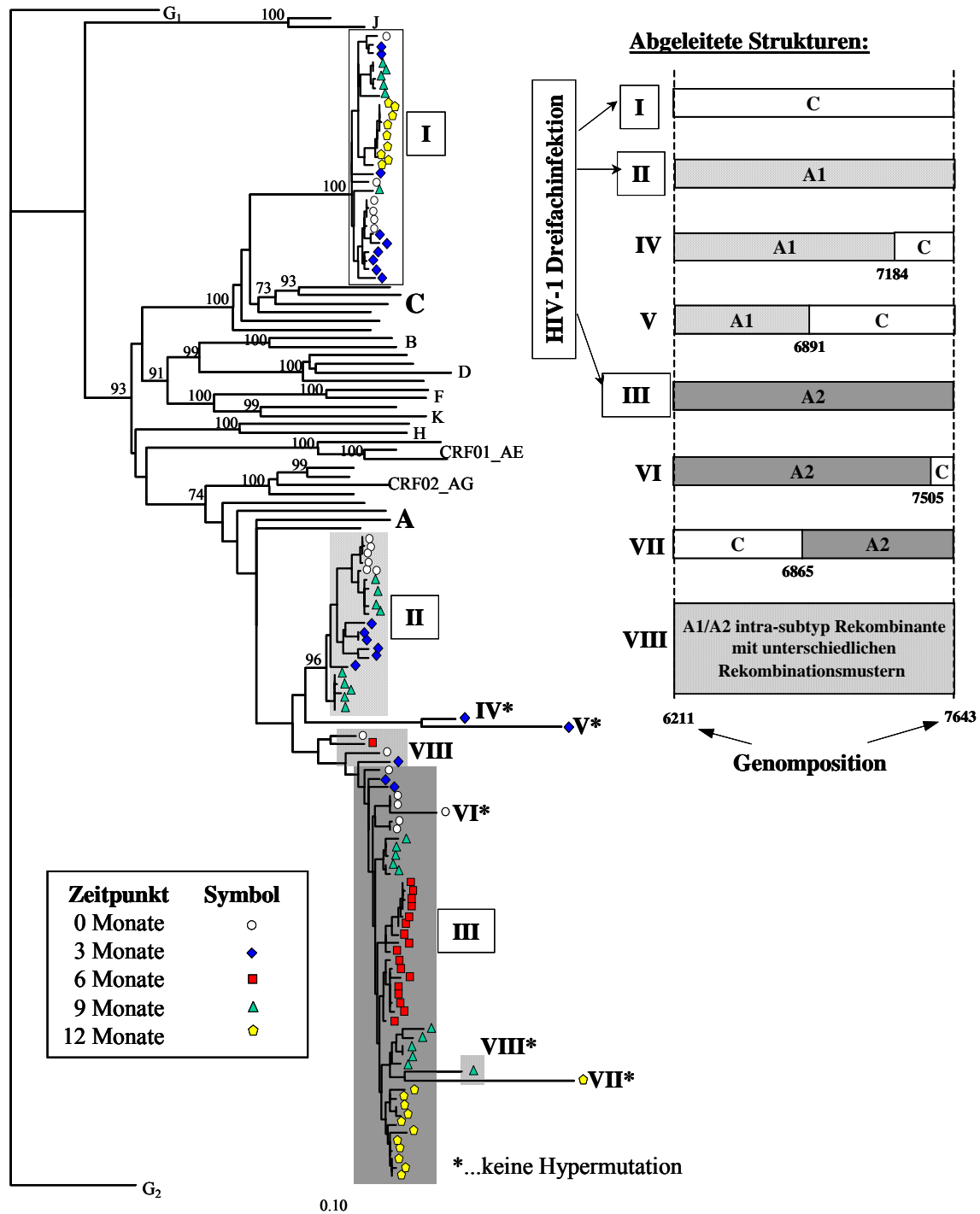
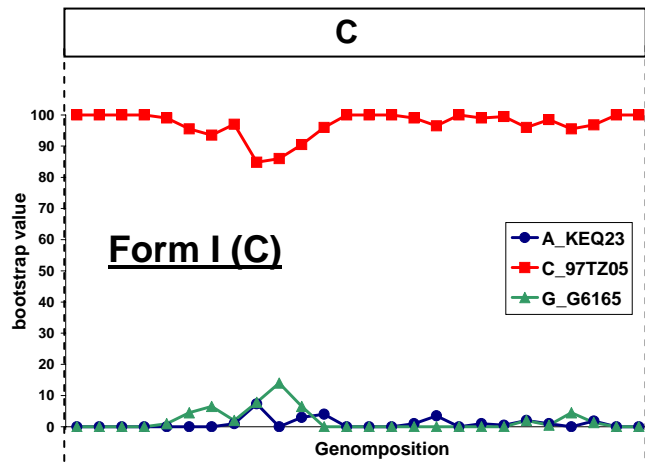
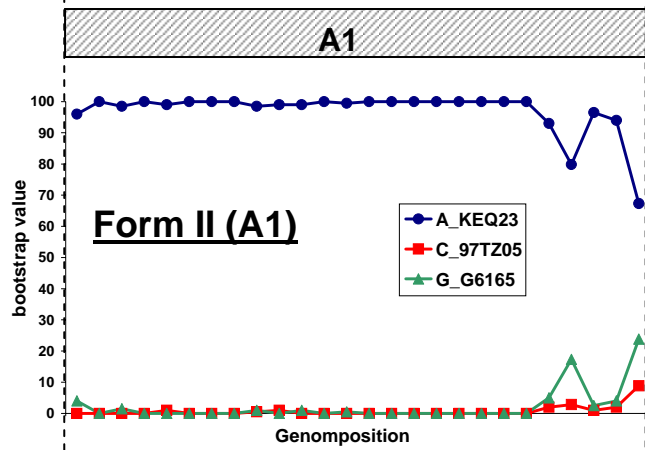


Bild 24. Phylogenetischer Stammbaum der Region 2 (vpu/GP120) mit 104 Nukleotidsequenzen der fünf aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte und den aus *bootscans* abgeleiteten Strukturen. Formen I bis III stellen vermutlich die infizierenden Stämme (Elternviren) dar; Formen IV bis VIII sind aus ihnen entstandene Rekombinante. Zahlen an den Knotenpunkten geben die signifikanten *bootstrap values* größer als 70% an. Genompositionen beziehen sich auf das Referenzisolat HXB2.

Elternform I = Subtyp C



Elternform II = Subtyp A



Elternform III = Subtyp A

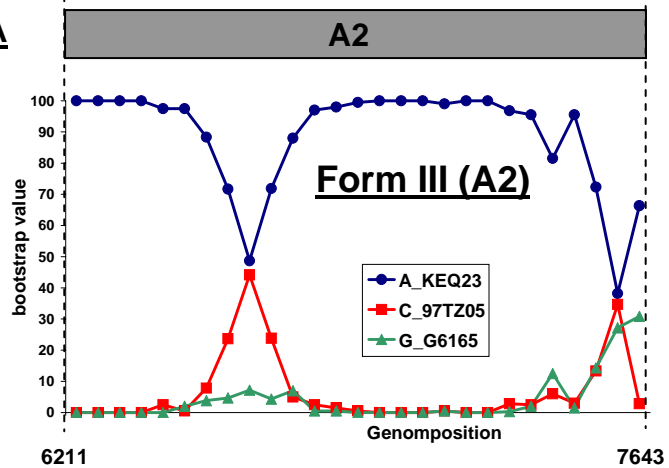


Bild 25. *Bootskans* der drei in Region 2 (vpu/GP120) identifizierten Elternformen I, II und III. Die Genomposition bezieht sich auf das Referenzisolat HXB2.

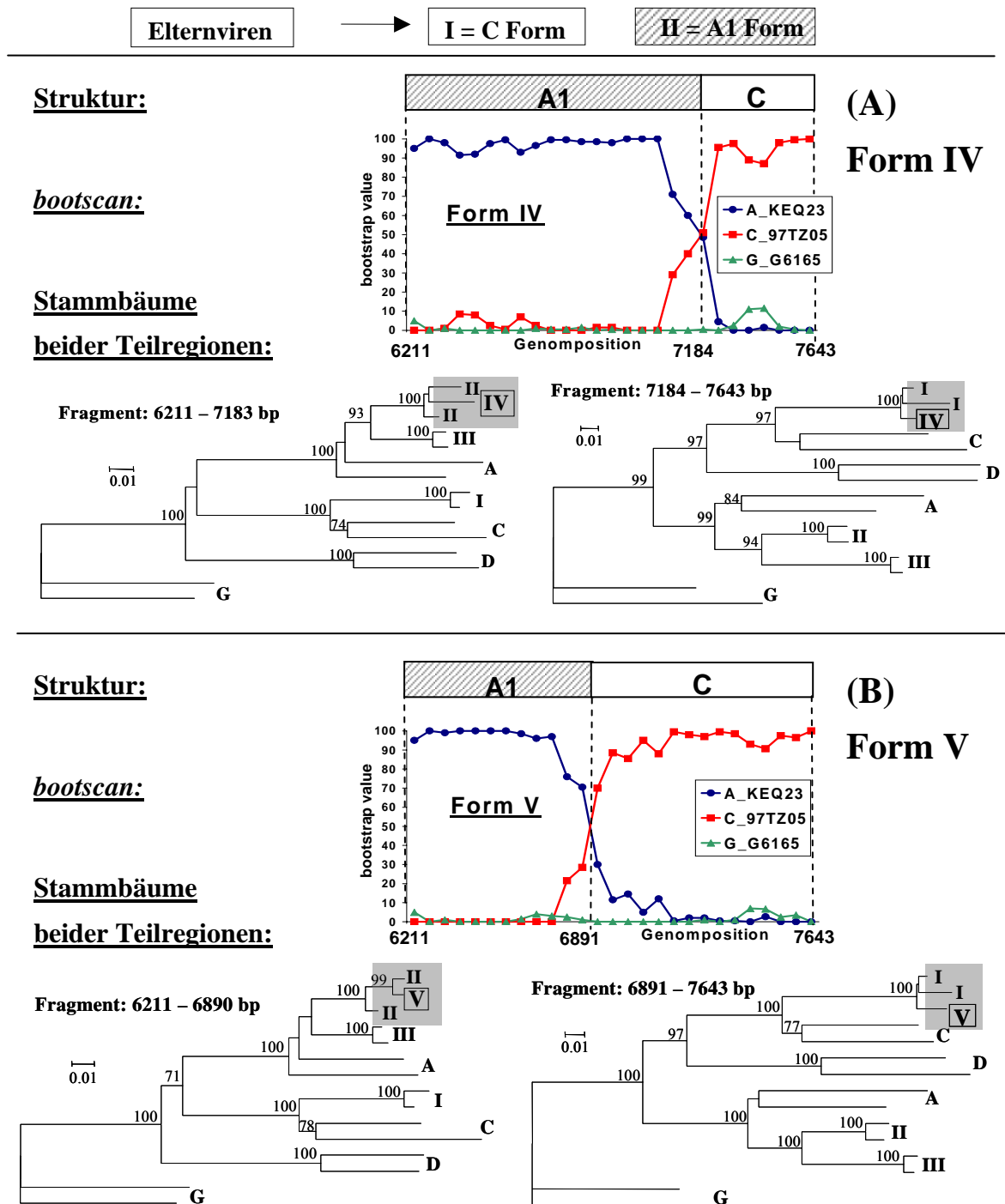
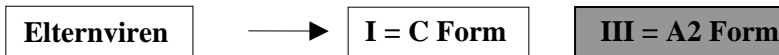


Bild 26. Detailanalyse der aus den Elternformen I und II entstandenen rekombinanten Formen IV (Teil A) und V (Teil B). Die *bootskans* geben die jeweiligen Rekombinationsstellen zwischen Subtyp A und C an. Die Genompositionen beziehen sich auf den Referenzstrang HXB2. Aus den phylogenetischen Stammbäumen der Teilregionen ist ersichtlich, dass die jeweiligen Teilfragmente der rekombinanten Formen mit denen der Elternstränge übereinstimmen, also von diesen abstammen. Subtyp G wurde als *outgroup* gewählt.

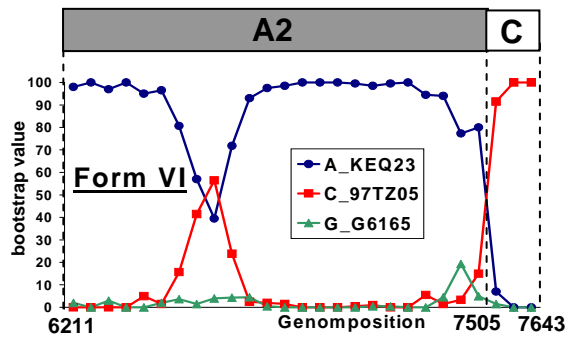


Struktur:

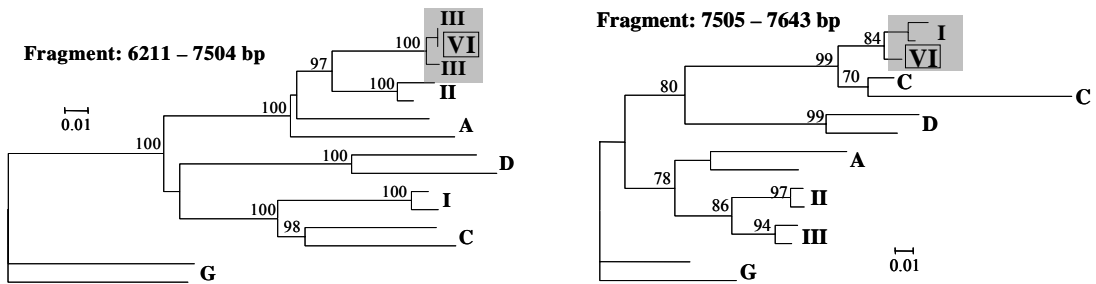
bootscan:

Stammbäume

der Teilregionen:



(A)
Form VI

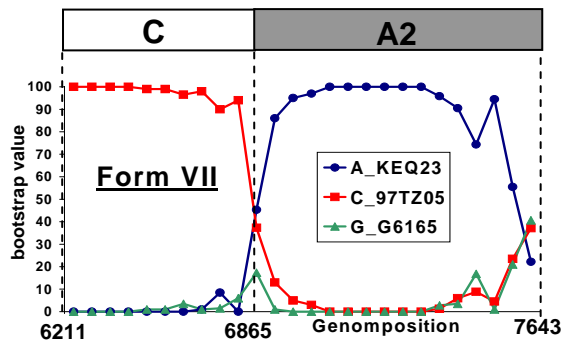


Struktur:

bootscan:

Stammbäume

der Teilregionen:



(B)
Form VII

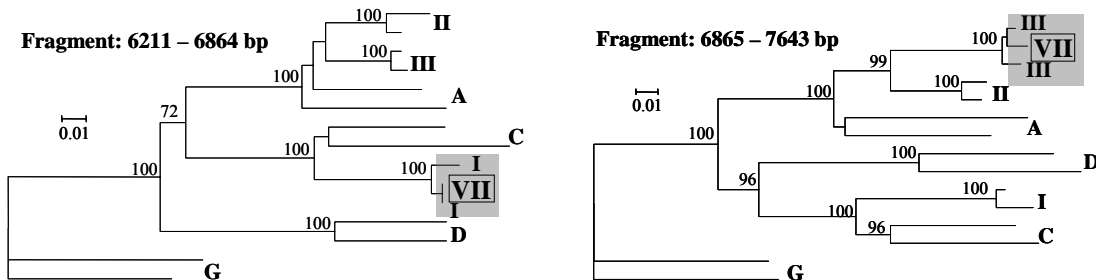


Bild 27. Detailanalyse der aus den Elternformen I und III entstandenen rekombinanten Formen VI (Teil A) und VII (Teil B). Die *bootscans* geben die jeweiligen Rekombinationsstellen zwischen Subtyp A und C an. Die Genompositionen beziehen sich auf den Referenzstrang HXB2. Aus den phylogenetischen Stammbäumen der Teilregionen ist ersichtlich, dass die jeweiligen Teilfragmente der rekombinanten Formen mit denen der Elternstränge übereinstimmen, also von diesen abstammen. Subtyp G wurde als *outgroup* gewählt.

Rekombinationsmuster der fünf identifizierten A1-A2-Rekombinanten der Form VIII

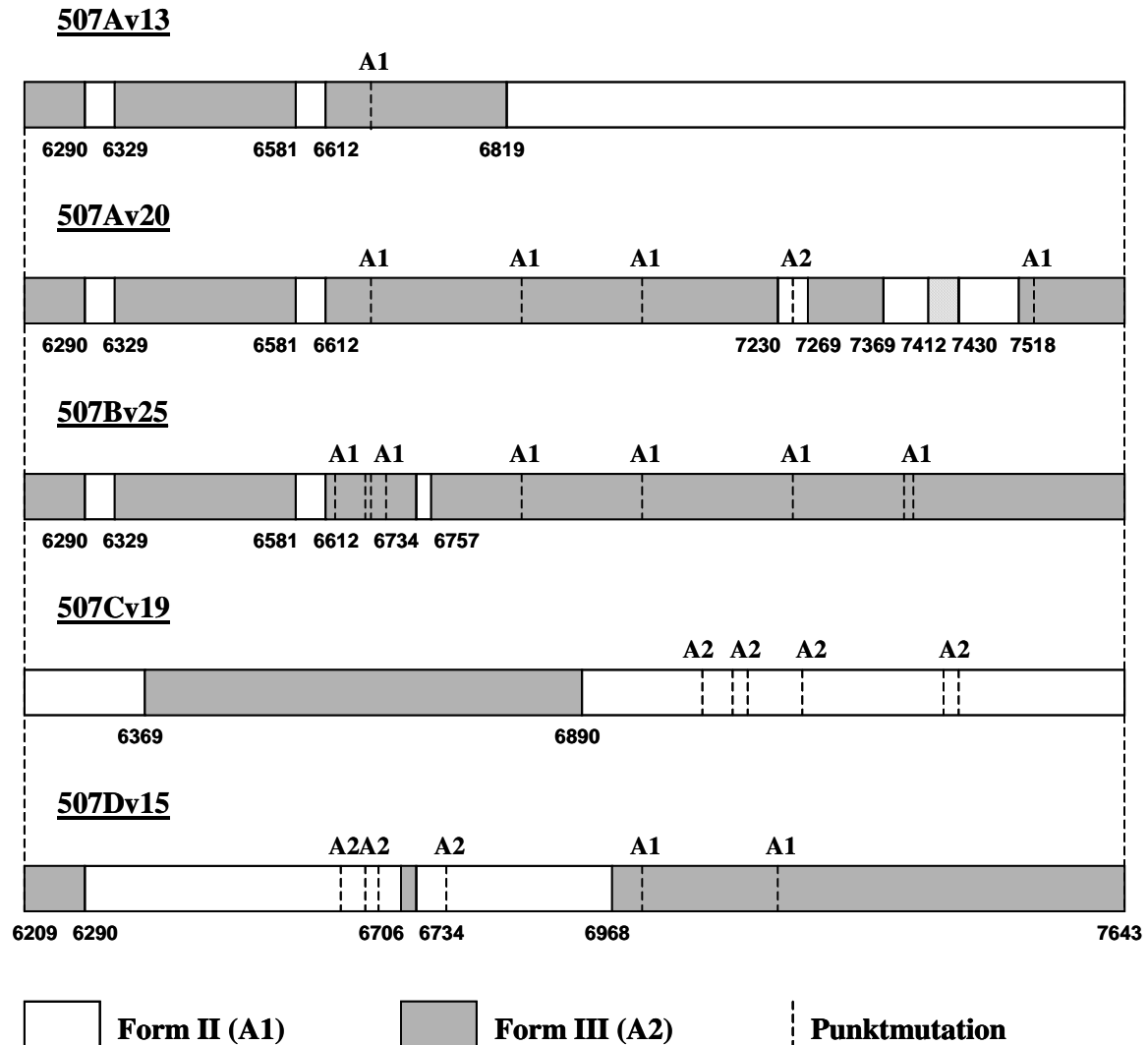


Bild 28. Strukturen der fünf A₁A₂-Rekombinanten mit Punktmutationen und Rekombinationsstellen. Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechende Genomposition im Referenzisolat HXB2.

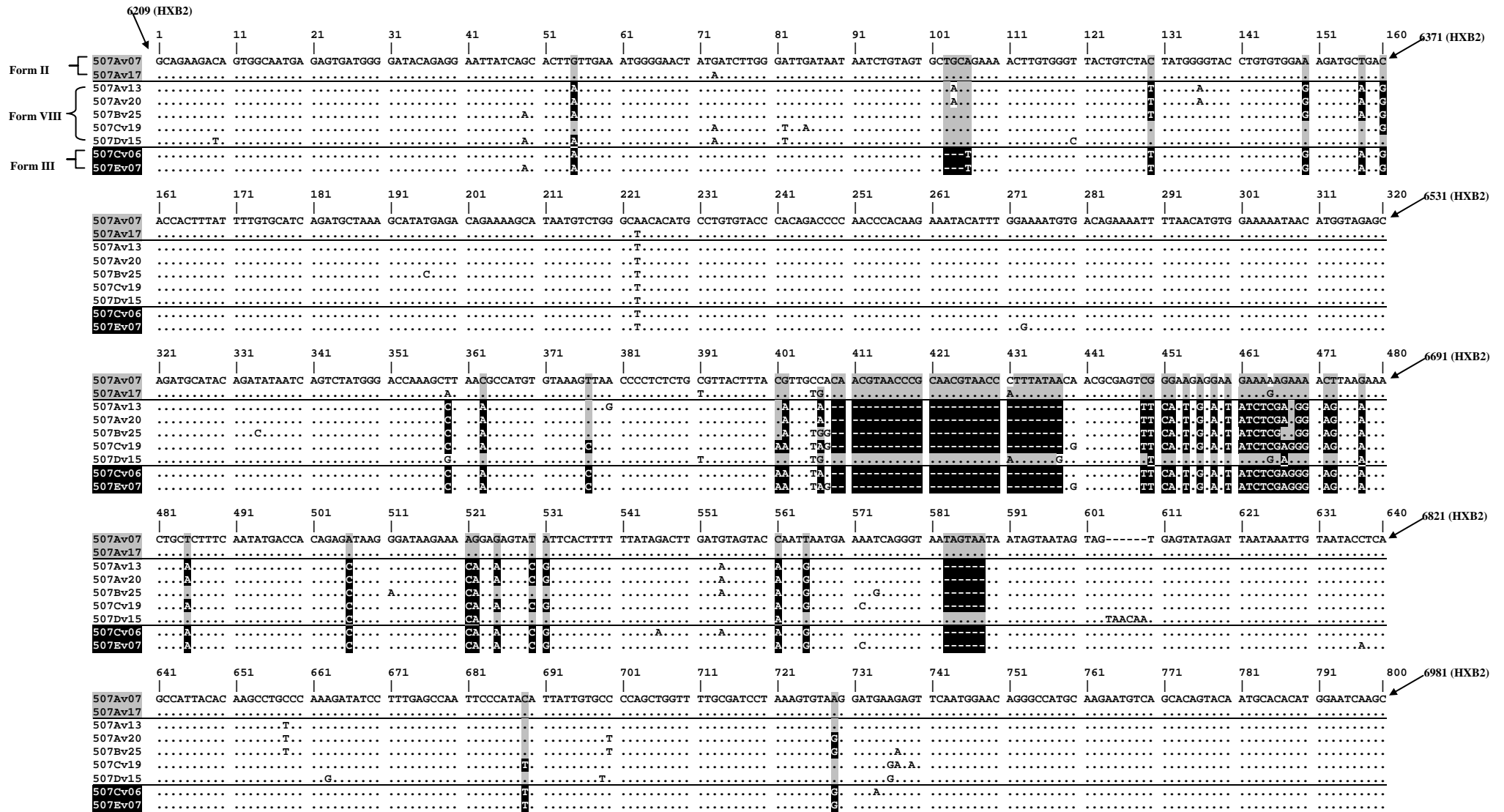


Bild 29. Sequenzen und Rekombinationsmuster der fünf identifizierten A1-A2-Rekombinanten im Vergleich zu den Elternformen II (A1-grau) und III (A2-schwarz).

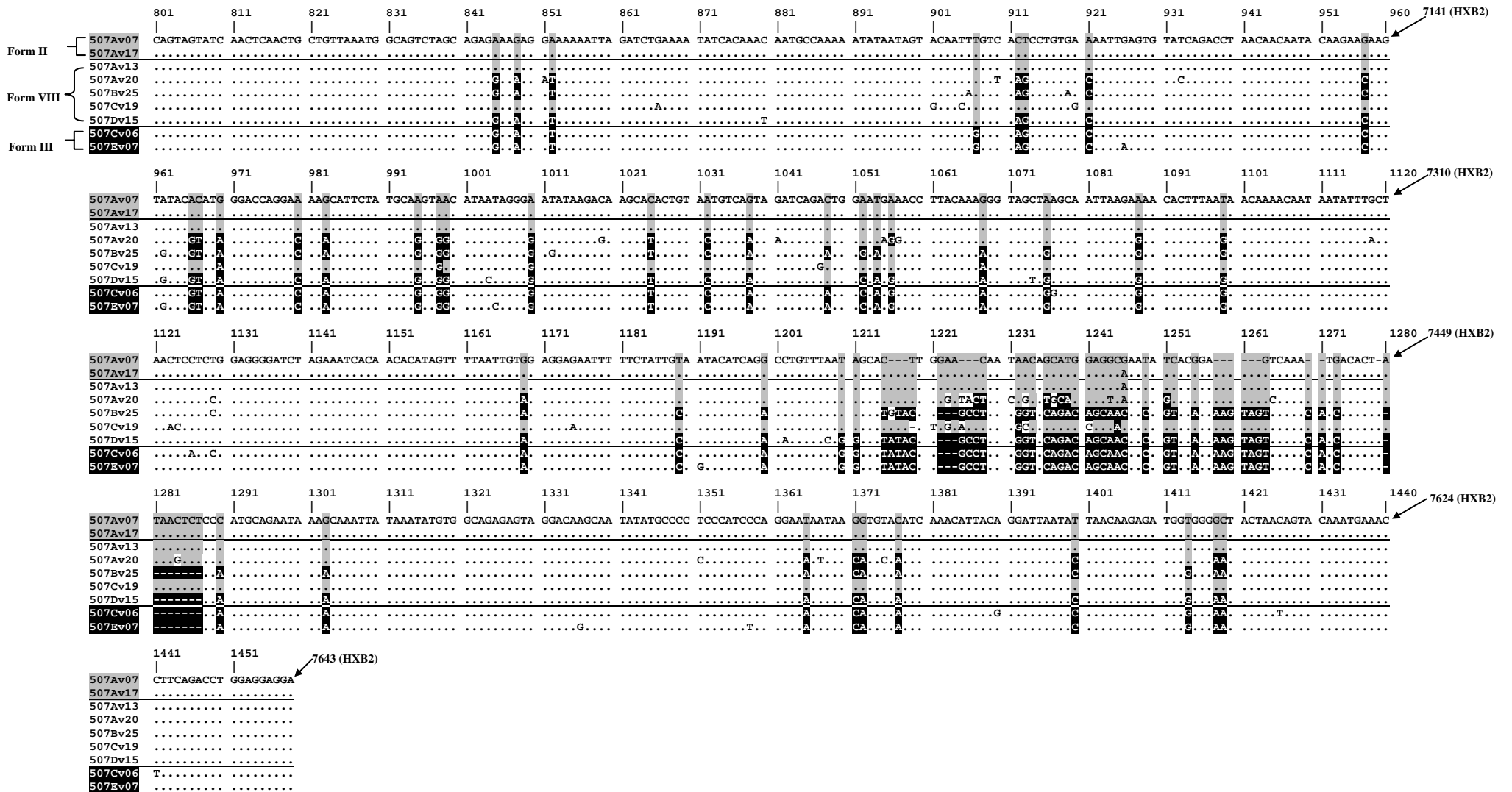


Bild 29. Fortsetzung

4.2.2.3 Region 3 (GP41/nef)

Die Analyse des das GP41-Protein und den Beginn des NEF-Proteins umfassenden Fragmentes beinhaltete 96 Sequenzen. **Bild 30** zeigt den phylogenetischen Stammbaum und die Strukturen der vier identifizierten molekularen Formen in dieser Genomregion.

Die Häufigste war Form I, ein Subtyp A Virus. Außerdem wurden drei rekombinante Formen (II, III und IV) gefunden. Die A und C Teilsequenzen aller dieser Formen stammten von den gleichen Elternviren der Subtypen A und C, wie durch Stammbäume von Teilregionen (Bild 31, Bild 32, Bild 33) und Distanzanalysen bestätigt werden konnte. Sowohl die Heterogenität zwischen den Sequenzen innerhalb einer Form, als auch zwischen den äquivalenten A-Regionen jeder Form sowie den C-Regionen der Formen II, III und IV lag unter 3,0%. Form II könnte neben Form I die zweite Elternform für die Formen III und IV darstellen, die dann durch ein bzw. zwei Rekombinationsereignisse entstanden sind. Je mehr dieser *crossovers* nötig waren, desto seltener wurde die entsprechende rekombinante Virusstruktur identifiziert.

Das gestreifte Fragment in Form IV konnte aufgrund seiner geringen Länge nicht klassifiziert werden.

Phylogenetischer Stammbaum für Region 3 (gp41/nef)

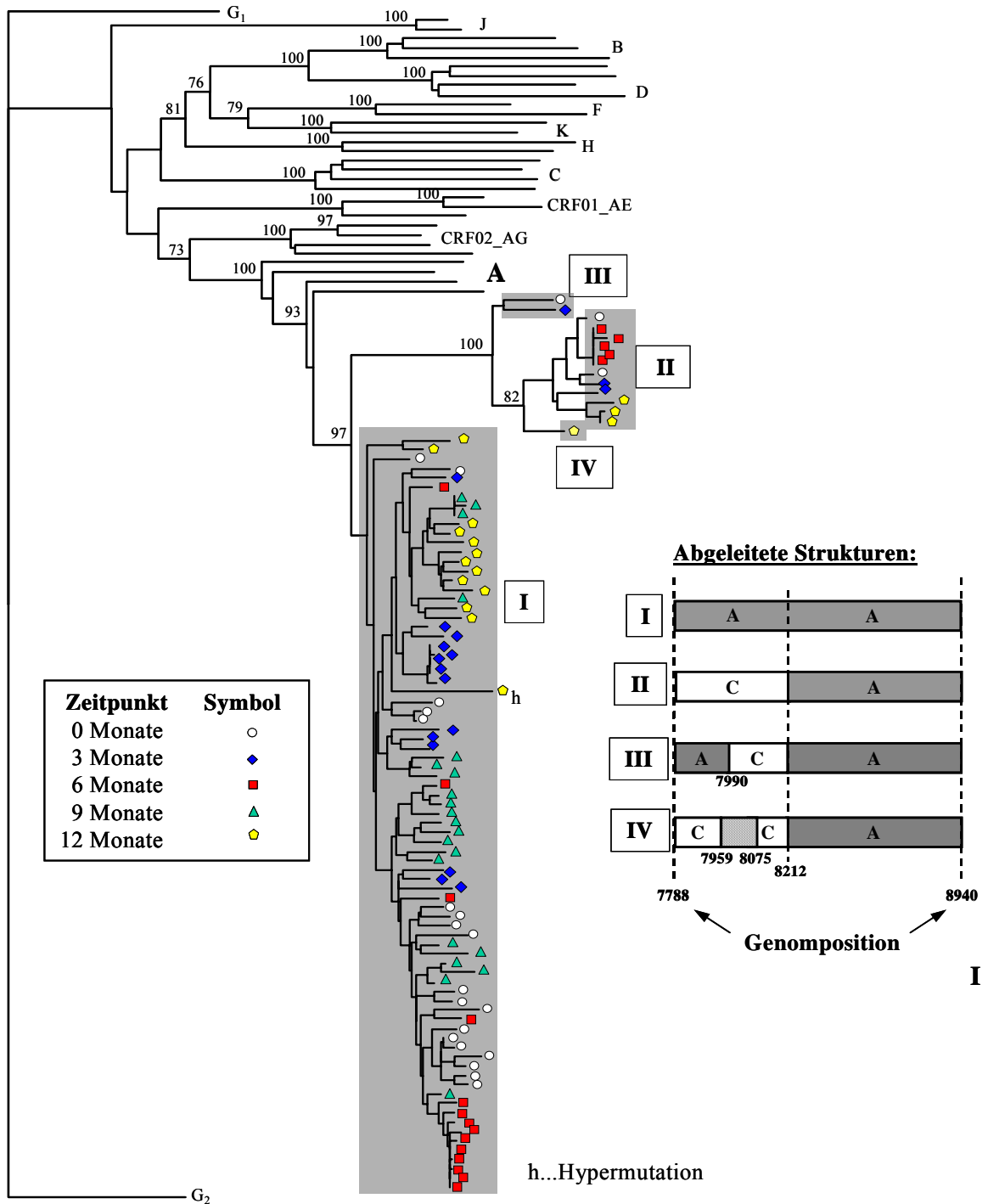
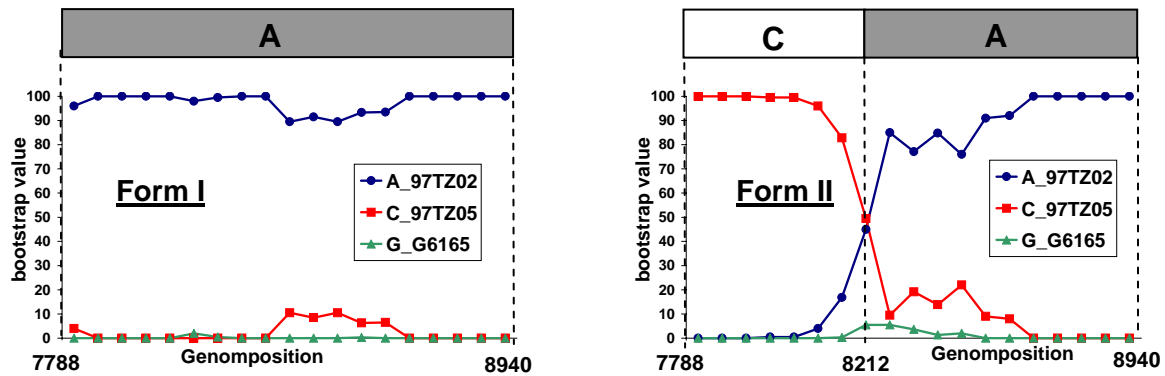


Bild 30. Phylogenetischer Stammbaum der Region 3 (GP41/nef) mit 96 Nukleotidsequenzen der fünf aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkte und den aus *bootscans* abgeleiteten Strukturen. Zahlen an den Knotenpunkten des Baumes geben die signifikanten *bootstrap values* größer als 70% an; Sequenz „h“ ist eine Hypermutation. Genompositionen beziehen sich auf das Referenzisolat HXB2.

(A) Bootskans und daraus abgeleitete Strukturen für die Formen I und II



(B) Stammbäume für die Teilregionen der Form II

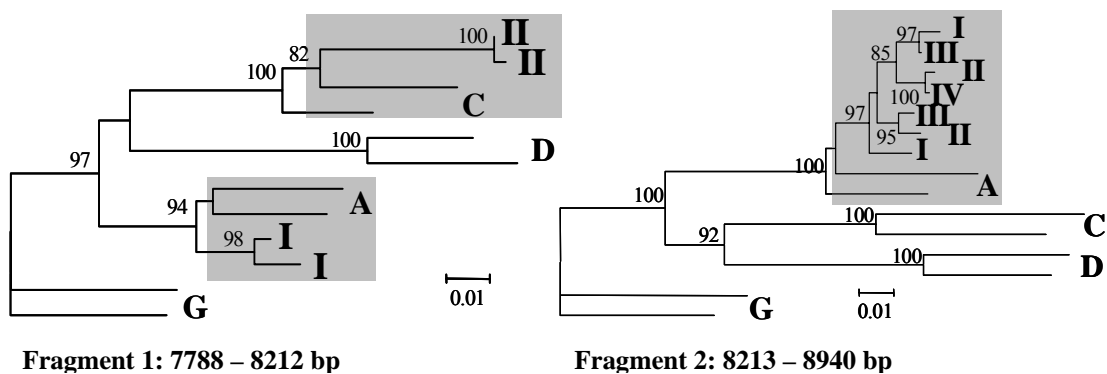
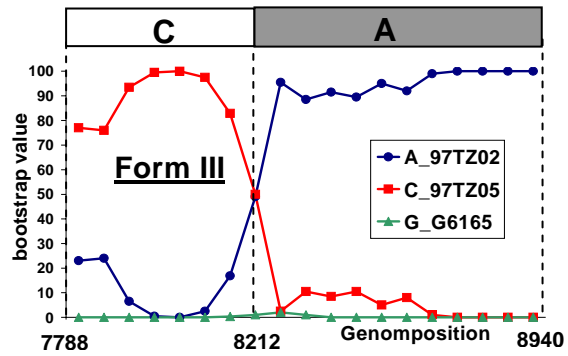


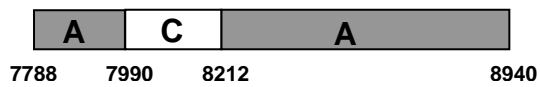
Bild 31. (A) *Bootskans* und Strukturen für die Formen I und II. Form I ist ein reiner Subtyp A und vermutlich Elternstrang für die Formen II, III und IV. Form II ist eine rekombinante Form entstanden aus Form I und einem nicht identifizierten C Subtyp. Die Genompositionen beziehen sich auf das Referenzisolat HXB2. (B) Der Stammbaum des ersten Fragmentes bestätigt die Vermutung, dass der erste Teil von Form II einem C Subtyp zuzuordnen ist, während Form I einem Subtyp A entspricht. Aus dem zweiten Baum wird ersichtlich, dass die A-Fragmente der Formen II, III und IV mit dem der Form I *clustern*, und demzufolge von ihm abstammen.

**aus bootscan
abgeleitete Struktur:**

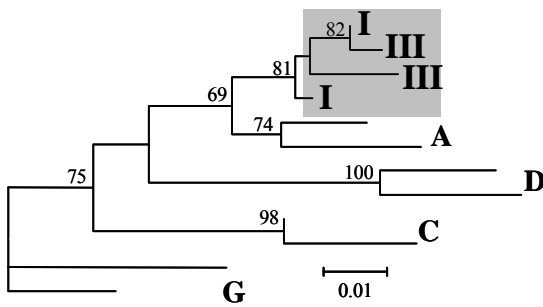


nach *Informative Site Analysis*
und manuellem Sequenzvergleich

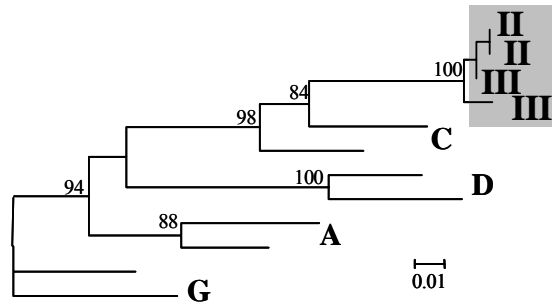
korrigierte Struktur:



Bestätigung durch Stammbäume der beiden ersten Teilfragmente:



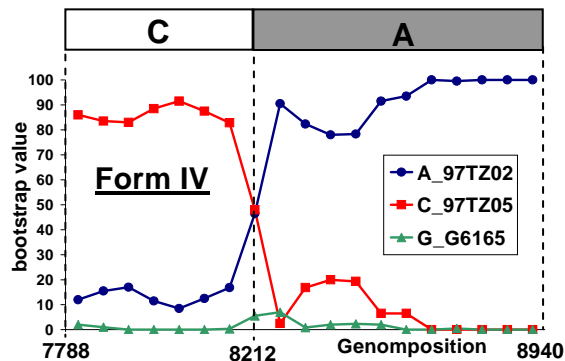
Fragment 1: 7788 – 7990 bp
clustert mit der Elternform I



Fragment 2: 7991 – 8212 bp
clustert mit der Elternform II

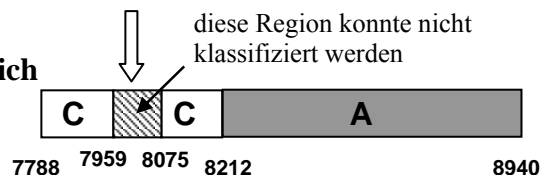
Bild 32. Detailanalyse der rekombinanten Form III.

aus *bootscan*
abgeleitete Struktur:

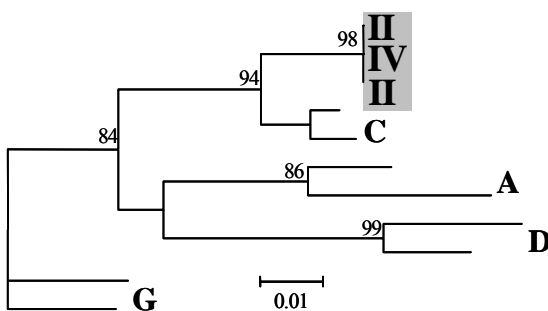


nach *Informative Site Analysis*
und manuellem Sequenzvergleich

korrigierte Struktur:

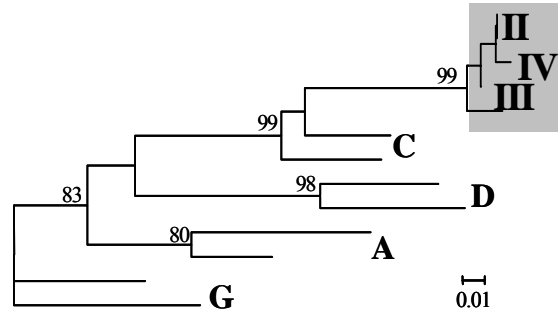


Bestätigung durch Stammbäume der beiden Teilfragmente:



Fragment 1: 7788 – 7959 bp

clustert mit der Elternform II



Fragment 2: 8075 – 8212 bp

clustern mit der Elternform II

Bild 33. Detailanalyse der rekombinanten Form IV

4.2.2.4 Longitudinale Analyse der molekularen Formen in den drei Genomregionen

In allen Regionen gab es relativ starke Schwankungen in den Proportionen der verschiedenen Virusstrukturen über den untersuchten Zeitraum von einem Jahr. Es gab weder eine Tendenz zu stärkerer Diversifizierung noch zu stärkerer Homogenität innerhalb der viralen *quasispecies* in diesem Zeitraum. In den Regionen 2 und 3 bildeten rekombinante Formen generell einen geringeren Prozentsatz als die reinen Subtypen. Im Gegensatz zu den anderen beiden Regionen dominierte in Region 3 (GP41/*nef*) eine Form, nämlich Form I, die *quasispecies* zu allen Zeitpunkten und stellte insgesamt 84% aller Sequenzen (Bild 34).

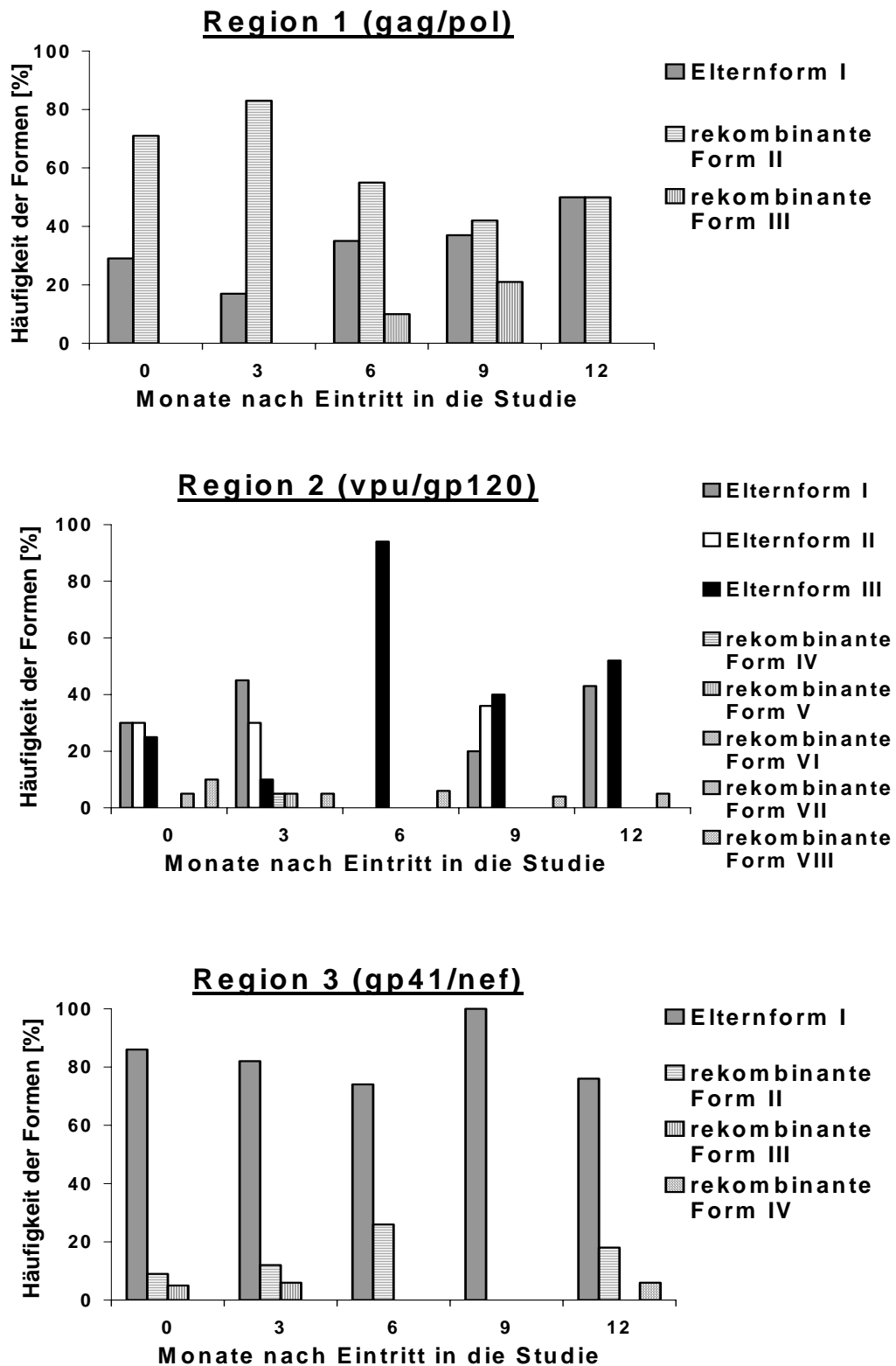


Bild 34. Temporale Fluktuation der molekularen Virusformen in den drei untersuchten Regionen. Die Rubrikenachse bezeichnet die fünf analysierten Zeitpunkte; die Ordinatenachse gibt den prozentualen Anteil jeder Form zum jeweiligen Zeitpunkt an.

4.2.3 Evaluierung des PCR-Ansatzes mit multiplen Primern

Um herauszufinden, ob der PCR-Ansatz mit mehreren Primern tatsächlich eine verbesserte Amplifikation von verschiedenen in der Probe vorhandenen HIV-Varianten mit sich brachte, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dieses wurde in der Region 2 (*vpu*/GP120) mit der Probe des letzten analysierten Zeitpunktes (12 Monate) durchgeführt. Nach Amplifikation mit den vier Primerkombinationen a, b, c und d wurden die PCR Produkte nicht gemischt, sondern separat kloniert, um die mit den jeweiligen Primern amplifizierten HIV-Varianten zu identifizieren. Mindestens 20 Klone von jeder Reaktion wurden sequenziert und analysiert.

Wie in **Bild 35** gezeigt, konnten unter den 103 Sequenzen mindestens drei verschiedene molekulare Formen identifiziert werden. 81% der Sequenzen entsprachen der Form III (reiner A Subtyp), 18% der Form I (reiner C Subtyp), und die rekombinante Form VII wurde nur einmal detektiert. Die getrennte Analyse jeder Primerkombination ergab einen signifikanten Amplifikationsbias. Im Setup b und d konnte der Subtyp C nicht detektiert werden, während er im Setup a und c, sowie im ursprünglichen Experiment, in dem alle Produkte vor dem Klonieren gemischt wurden, bei mindestens 20% der Sequenzen vorlag.

Da die Anzahl der Sequenzen, die durch Klonieren und Sequenzieren analysiert werden können, begrenzt ist, wurde der sensitivere MHA_{ACD} eingesetzt, um die An- bzw. Abwesenheit der beiden molekularen Formen zu bestätigen. Er kann noch in einer Mischung von 1:3000 eine Virusvariante detektieren (67). Der MHA_{ACD} bestätigte sowohl die Anwesenheit der Subtypen A und C in Setup a und c, als auch die Abwesenheit des Subtyps C in Setup b und d.

(A) Phylogenetischer Stammbaum für Region 2 (*vpu/gp120*), Sequenzen des letzten Analysezeitpunktes, 12 Monate nach Aufnahme in die Studie

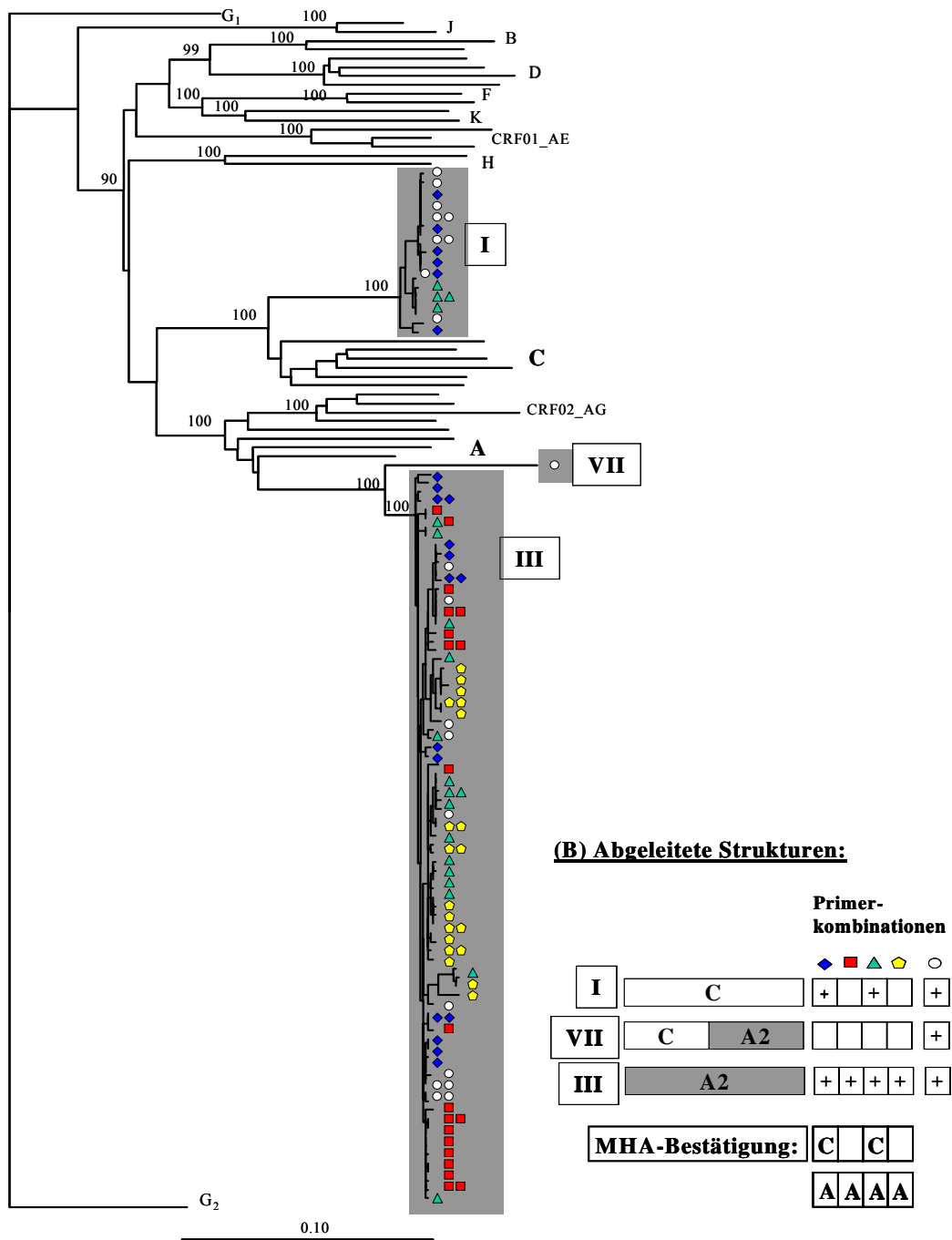


Bild 35. (A) Phylogenetischer Stammbaum aller Nukleotidsequenzen des letzten Analysezeitpunktes in der Region 2 (*vpu/GP120*). A(◆), b(■), c(▲) und d(●) beziehen sich auf die Sequenzen, gewonnen aus den jeweiligen PCR Produkten, die durch die vier verschiedenen Primerkombinationen amplifiziert wurden. Für die fünfte Gruppe (○) wurden alle Amplikons vor dem Klonieren und Sequenzieren gemischt. (B) Strukturen der drei molekularen Formen und die Primerkombinationen, durch die sie amplifiziert wurden.

5 Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Der Multiregion Hybridisation Assay (MHA)

Um große Probenzahlen auf rekombinante Viren und HIV-1 Doppelinfektionen hin zu untersuchen, bedarf es einer schnellen und kostengünstigen, aber dennoch genügend sensitiven Methode. Daher wurde vor einiger Zeit in unserer Arbeitsgruppe der MHA zur systematischen Detektion von HIV-1 Subtypen, rekombinanten Viren und Doppelinfektionen in großen Populationen entwickelt (67). Gegenüber bisherigen Subtypisierungsmethoden, wie dem *V3-Loop* ELISA, dem Heteroduplex Mobility Assay (HMA) und der Sequenzierung kleiner Genomfragmente bzw. des gesamten Genoms, bietet er entscheidende Vorteile.

Im *V3-Loop* ELISA wird nur eine (V3-Schleife) und im HMA werden 2 Regionen (*gag* und *env*) des Genoms analysiert. Durch die Genotypisierung kurzer Fragmente in fünf verschiedenen Genomregionen (*gag*, *pol*, *vpu*, *env*, GP41) erhöht sich bei Anwendung des MHA die Wahrscheinlichkeit der Identifikation von rekombinanten Viren erheblich. So lag die Sensitivität des Assays während der Validierung bei 89%, bezogen auf die entsprechenden Gesamtgenomsequenzen (67).

Mit der Goldstandardmethode, der Gesamtgenomsequenzierung, können ebenfalls rekombinante Viren detektiert werden. Zeit- und Kostenaufwand aber sind enorm. Gleiches gilt für die Identifizierung von Doppelinfektionen, da hier immer ein einzelnes HIV-Genom isoliert werden muß (z. B. durch Klonieren), um eine eindeutige und gut lesbare Sequenz zu erhalten. Mit dem MHA dagegen ist die Identifizierung von rekombinanten Viren und Doppelinfektionen mit vergleichsweise geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand bei guter Sensitivität möglich, was ihn zu einem geeigneten Screeningtest für hohe Probendurchsätze macht. Während der Validierung konnten bei 45 zuvor sequenzierten Proben sieben vorher nicht entdeckte Doppelinfektionen durch den Assay nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Mischungsversuche, dass der MHA zwei Subtypen, die im Verhältnis 1:3000 vorlagen, erkennen kann (67).

Aber auch der MHA besitzt seine Limitationen. Er erkennt nur die Subtypen, für die er konzipiert wurde. Es müssen also zunächst mittels Sequenzierung für jede Epidemie Referenzstämme charakterisiert werden, aufgrund derer dann ein MHA entwickelt werden kann. Da aber die meisten Epidemien nicht landesspezifisch sind, sondern regional sehr ähnlich, reichen weltweit fünf bis sechs MHA-Versionen aus. Bis heute sind Tests für Ostafrika (Subtypen A, C, D), Westafrika (A, CRF_{AG}, G), Südamerika (B, F) und Südostasien (B, C, E) entwickelt worden (61, 67, 112). Für die vorliegende Arbeit wurde der MHA für Ostafrika, auch als MHA_{ACD} bezeichnet, verwendet.

Außerdem kann der MHA im Gegensatz zum HMA und zur Sequenzierung nur zwischen unterschiedlichen HIV-1 Subtypen unterscheiden. Intra-Subtyp-Rekombinationen und Doppelinfektionen mit verschiedenen Formen des gleichen Subtyps werden nicht erkannt. Denn je weniger sich zwei Viren in ihrer Basensequenz unterscheiden, desto schwieriger wird die Konstruktion sequenzspezifischer Sonden für die *real-time* PCR.

Alle fünf Genomregionen und alle Analysenzeitpunkte (*Follow ups*) zusammengenommen wurden insgesamt 2130 PCR Reaktionen durchgeführt, von denen bei 70% der Subtyp bestimmt werden konnte. Diese im Vergleich zur Validierung des Assays (89%) relativ geringe Sensitivität hat mehrere Gründe. Zum einen waren alle verwendeten klinischen Proben bis auf den positiven HIV-Test vorher noch völlig uncharakterisiert, also weder amplifiziert noch sequenziert worden. Es gab auch keine Daten zur Viruslast oder CD4-Zellzahl, woraus man auf die vorhandene Menge viraler DNA hätte schließen und ggf. einige Proben von der Analyse hätte ausschließen können. Es fand keine Wiederholung statt. Die DNA jeder Probe wurde nur einmal extrahiert und amplifiziert. Zum anderen war die Performance des MHA in der *env*-Region mit einer Sensitivität von nur knapp 47% sehr schlecht. Die GP41-Region dagegen konnte mit 88% an das Validierungsergebnis des Tests anknüpfen.

Als Ursachen für die vergleichsweise geringe Sensitivität kommen zwei Faktoren in Frage. Aufgrund der hohen Variabilität von HIV, vor allem in der *env*-Region, kam es aufgrund von Mismatches zwischen Primern und Zielsequenz in durchschnittlich 14,3% der Fälle nicht zur Amplifikation. In 18,3% der Reaktionen konnte aus den gleichen Gründen die Hybridisierungssonde nicht an das Amplikon binden, weshalb ebenfalls

keine Subtypisierung möglich war. Wie im zweiten Teil der Arbeit näher erläutert, könnte die Sensitivität des MHA durch den Einsatz multipler Primerpaare verbessert werden. Bei 10 der 75 Studienteilnehmerinnen konnte der HIV-1 Subtyp nur in einer oder zwei Genomregionen bestimmt werden. Eine zu geringe Konzentration der extrahierten HIV-DNA aufgrund zu weniger Viruskopien in den Zielzellen könnte hier die Ursache sein.

5.1.2 PCR-Amplifikation mit multiplen Primerpaaren

Um ein detailliertes und unverfälschtes Bild von der viralen Population in einer, mit HIV-1, infizierten Person zu erhalten, muss eine möglichst vollständige Amplifikation aller, in der Probe vorhandenen, Virusformen gewährleistet sein. In einem normalen PCR Format mit zwei Primern je PCR Runde kann es jedoch vor allem bei Genomen, die eine hohe Variabilität aufweisen, vermehrt zu Mismatches zwischen Primer und Zielsequenz kommen. Bestimmte Formen werden so nicht oder nur ineffektiv amplifiziert. Zwei oder mehr Primerpaare je PCR Runde erhöhen dagegen die Chancen, auch solche Varianten zu erfassen. So wird eine durch Primermismatch bedingte selektive Amplifikation minimiert, und die Sensitivität der PCR für ein breiteres Spektrum an viralen Formen erhöht sich.

Auf der Grundlage oben erläuteter These wurde für die longitudinale Analyse der viralen *quasispecies* in einer Studienteilnehmerin, die laut MHA-Subtypisierungsergebnis doppelt infiziert war, eine Amplifikationsmethode entwickelt. Drei 1,1 bis 1,4 kB lange Genomfragmente (*gag/pol*, *vpu/GP120*, *GP41/nef*) wurden in einem verschachtelten PCR Format mit je vier verschiedenen Primerkombinationen (zwei Primerpaare je PCR Runde) amplifiziert (siehe Kap. 3.5.2). Die Produkte dieser vier separaten PCR-Reaktionen wurden daraufhin gemischt, um den Arbeitsaufwand für die nachfolgende Klonierung und Sequenzierung zu verringern. Eine direkte Sequenzierung der Amplifikate ohne vorherige Klonierung war nicht möglich, da es sich hier um eine potenzielle Doppelinfektion handelte. Im Chromatogramm hätten sich beide Sequenzen überlagert und wären nicht eindeutig lesbar gewesen.

Die Frage, ob die mit dieser Methode detektierten Anteile an molekularen Virusformen reproduzierbar sind, wurde im Zuge der Analyse einer Studienteilnehmerin mit einer HIV-1 Superinfektion aus derselben Hochrisikogruppe von Francine McCutchan

untersucht. Dazu wurde das Genomfragment GP41/*nef* zweimal nach oben beschriebener Methode mit den gleichen vier Primerkombinationen unabhängig voneinander amplifiziert. Die PCR Produkte wurden gemischt, kloniert und je 19 Klone sequenziert. Der Vergleich der viralen *quasispecies* in beiden Experimenten zeigte, dass die prozentualen Anteile der häufigsten Formen ähnlich, wenn auch nicht identisch, waren, die sehr seltenen Formen jedoch nur unregelmäßig detektiert wurden (111). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, weil bei nur 19 sequenzierten Klonen eine reproduzierbare Erfassung der selteneren viralen Varianten statistisch nicht möglich ist. Während also die Methode für die die *quasispecies* dominierenden molekularen Formen eine reproduzierbare quantitative Einschätzung ihrer prozentualen Anteile liefert, müssten wesentlich mehr Klone sequenziert werden, um dies auch für seltenere Varianten zu gewährleisten.

Ob die in dieser Arbeit angewandte Amplifikationsmethode mit multiplen Primerpaaren tatsächlich sensitiver bei der Erfassung verschiedener viraler Formen ist als eine konventionelle PCR, wurde durch ein weiteres Experiment untersucht. Dazu wurden die vier PCR Produkte der Genomregion *vpu*/GP120 des letzten *Follow ups* nicht vor dem Klonieren gemischt, sondern separat behandelt. Die Auswertung ergab, dass nur zwei der vier Primerkombinationen, nämlich a und c, sowohl Subtyp A und C amplifizierten, während die Primerkombinationen b und d nur den Subtyp A vervielfältigten. Um auszuschließen, dass die Selektion von Subtypen während der Klonierung geschah, wurden die vier PCR Amplifikate separat einem MHA unterzogen, der das Ergebnis bestätigte. Die richtige Wahl der Primersequenzen und der Einsatz multipler Primerpaare für die Amplifikation kann demzufolge die Wahrscheinlichkeit einer Detektion von Mehrfachinfektionen erhöhen und ein möglichst vollständiges Bild der viralen *quasispecies* vermitteln.

Limitationen der verwendeten Methodik, welche besonders die reproduzierbare quantitative Bestimmung der Anteile vor allem von in geringer Konzentration zirkulierenden Virusformen erschweren, seien im Folgenden zusammengefasst und erläutert.

1. In jeder PCR kann nur eine limitierte Zahl an Viruskopien verwendet werden. Für die in dieser Arbeit analysierten Proben handelte es sich um 27 bis 66

provirale DNA Kopien, die aus 400.000 bis 1.000.000 PBMCs extrahiert und in der ersten PCR Runde eingesetzt wurden (52).

2. Die Selektion bestimmter molekularer Formen durch Primerbias ist ein nicht zu unterschätzender limitierender Faktor für alle PCR-Amplifikationen von schnell mutierenden viralen Genomen wie dem des HIV. Dieser Faktor wurde zwar durch die Verwendung multipler Primer minimiert, konnte aber sicherlich nicht ganz eliminiert werden. Für eine noch exaktere Reproduktion der viralen *quasispecies* wäre in zukünftigen Ansätzen sogar der Einsatz von mehr als zwei Primerpaaren pro PCR Runde denkbar.
3. Beim Mischen der vier Amplifikate entsteht ein gewisser Verdünnungseffekt der PCR Produkte, der theoretisch dazu führen kann, dass besonders gering konzentrierte Varianten nicht mehr detektiert werden. Der beste Ansatz wäre daher der vorher beschriebene, nämlich das separate Klonieren und Sequenzieren der vier Amplifikate. Dies ist aber sehr zeit- und kostenintensiv und der Verdünnungseffekt doch so minimal, dass nicht in jedem Fall der Nutzen den Aufwand rechtfertigen würde.
4. Die Zeit- und Kostenintensität der Sequenzierung (auch vergleichsweise kleiner Genomfragmente) limitiert die Anzahl der Klone, die untersucht werden können. Außerdem kann eine durch die molekulare Klonierung eingeführte Selektion bestimmter viraler Varianten nicht ganz ausgeschlossen und müsste genauer untersucht werden. Für eine genaue Quantifizierung der molekularen Formen wäre die Analyse von weit mehr als 20 Klonen notwendig.

Die schnelle Evolution von HIV-1 bedingt durch eine hohe Mutationsrate und kurze Generationszeit kann zu Mismatches zwischen Primern und Zielsequenz führen. Der Einsatz multipler Primer für die PCR mit nachfolgender Klonierung und Sequenzierung bietet trotz der erläuterten Limitationen einen effizienten Ansatz zur Charakterisierung der viralen Populationen in einem, mit HIV-1, infizierten Individuum und zur Bestätigung von HIV-1 Mehrfachinfektionen.

5.2 Prävalenz und Auswertung der HIV-1 Subtypenbestimmung mittels MHA_{ACD}

Die Prävalenz von HIV-1 in der untersuchten Bevölkerungsgruppe der Barfrauen lag zu Beginn der Studie bei 67,8%. Diese hohe HIV-1 Durchseuchung entspricht in etwa den Ergebnissen einer 2001 veröffentlichten Studie in Hochrisikobevölkerungsgruppen der Nachbarländer Kenia und Sambia, in denen die Prävalenzen bei 74,4% für Kenia bzw. 67,6% für Sambia lagen (117). In der Normalbevölkerung von Tansania, Kenia und Sambia liegt die HIV-1 Prävalenz mit 17%, 25,8% und 28,3% jedoch weitaus niedriger (60, 82, 117).

5.2.1 HIV-1 Subtypenverteilung zum Zeitpunkt F0 bei Eintritt in die Studie

Bisherige Studien zur Subtypenverteilung ergaben ein heterogenes Bild der HIV-1 Epidemie in Tansania, die vor allem durch die Subtypen A und D und seit einigen Jahren in zunehmendem Maße auch durch den Subtyp C gekennzeichnet ist. Dazu kommen auch immer mehr rekombinante Viren, sogenannte *Unique Recombinant Forms* (URFs). Je nach Region variieren die prozentualen Anteile der einzelnen Subtypen und ähneln vor allem in den Grenzgebieten denen in den Nachbarländern (15, 68, 80, 95). Im Süden dominiert wie im angrenzenden Malawi und Mosambik der Subtyp C, im Nordwesten in den Grenzregionen zu Uganda findet man hauptsächlich Subtyp D und im Norden dominiert Subtyp A wie im Nachbarstaat Kenia (18, 80, 137). In der Region wurde neben A, C und D auch Subtyp B nachgewiesen (87). In einer Kohorte von Barfrauen in der Stadt Moshi fand man außerdem den in Kenia zum ersten Mal beschriebenen Subtyp A2 (88).

In der hier untersuchten Hochrisikogruppe von Barfrauen in der Region Mbeya im Südwesten Tansanias dominierte der HIV-1 Subtyp C mit 34%, gefolgt von rekombinanten Viren mit 32% und den Subtypen A und D mit nur 9 bzw. 5%. 20% aller untersuchten Studienteilnehmerinnen waren mit mehr als einem HIV-1 Subtyp infiziert. Diese Rangordnung mit C als dominantem Subtyp entspricht der in der Normalbevölkerung der Studienregion sowie des benachbarten Sambia (5, 117).

Die Subtypenverteilung bestätigt die Dominanz des Subtyps C in der Region Mbeya, der seit 1988 die HIV-1 Epidemie in diesem südlichen Landesteil bestimmt (Hölscher,

unveröffentlichte Daten). Dagegen konnte im Norden Tansanias bis 1995 kaum ein Subtyp C nachgewiesen werden, wie aus vorangegangenen Studien in unterschiedlichen Regionen hervorgeht. Er war geprägt durch die Subtypen A und D, wie sie in den Nachbarländern Kenia und Uganda zu finden sind. Die vorrangige Prävalenz des Subtyps C in Mbeya ist auf den großen Anteil von Einwanderern aus dem angrenzenden Malawi zurückzuführen, wo dieser Subtyp dominiert.

Bis heute breitet sich der Subtyp C allerdings auch immer mehr in den mittleren und nördlichen Gebieten Tansanias aus. Während einer Studie mit 6 bis 62 Wochen alten Säuglingen und Kleinkindern aus der Hauptstadt Daressalaam wurde 1997 mit 32,4% das erste Mal ein signifikant höherer Prozentsatz des Subtyps C beobachtet, der damit den 1988 noch stark dominierenden Subtyp D auf Platz drei hinter A und C verdrängte (137). Aus einer 2003 veröffentlichten Studie mit Barfrauen aus der Stadt Moshi an der kenianischen Grenze geht hervor, dass hier zwar immer noch der Subtyp A ganz klar mit 48% dominierte, immerhin 20% der Frauen aber schon mit dem Subtyp C infiziert waren, während D mit nur 8% fast vollständig verdrängt wurde (88).

Eine vorangegangene Studie mit 124 schwangeren Frauen und Blutspendern aus Mbeya zur Untersuchung der HIV-1 Subtypenverteilung in der Allgemeinbevölkerung der Region zeigte eine Subtypenverteilung ähnlich der in der Hochrisikokohorte (60). Der Anteil an Doppelinfektionen lag jedoch mit 20% bei den Barfrauen mehr als doppelt so hoch wie in der Allgemeinbevölkerung mit 9%. Dies deutet darauf hin, dass mit häufigerer HIV-Exposition auch die Wahrscheinlichkeit steigt, sich mit mehr als einer HIV-Variante zu infizieren. Ob es sich hierbei immer um Superinfektionen handelt, also die zeitlich voneinander getrennte Übertragung von zwei verschiedenen Viren, oder um simultane Kotransmissionen kann nur in einer longitudinalen Untersuchung von inzidenten HIV-Infektionen abschließend beantwortet werden.

In der Gruppe der innerhalb von 21 Monaten nach Eintritt in die Studie an AIDS Verstorbenen waren mehr als dreimal so viele Barfrauen doppelt infiziert als in der Gruppe der Frauen mit weniger weit fortgeschrittener HIV-1 Infektion (30% versus 9%). Je länger also die Frauen mit dem Virus infiziert waren, desto höher war die Wahrscheinlichkeit einer Doppelinfektion. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Mehrzahl der Doppelinfektionen um im Laufe der Primärinfektion

aquirierte Superinfektionen handelt. Lägen Koinfektionen vor, würde deren Anteil nicht von der Dauer der Infektion abhängen, sondern wäre zu jedem Zeitpunkt nach dem Aufbau einer funktionierenden Immunantwort ungefähr gleich hoch, da hier die Übertragung beider Viren vor der Serokonversion erfolgt. Es besteht also sowohl eine Korrelation zwischen dem Risikoverhalten der Infizierten und der Prävalenz von Doppelinfektionen sowie rekombinanten Viren, als auch ein Zusammenhang zwischen der Dauer einer HIV-Infektion und der Wahrscheinlichkeit einer Superinfektion.

Andererseits zeigt eine Studie aus Südafrika, dass HIV-1 Doppelinfektionen einen schnelleren Krankheitsverlauf verursachen und damit schneller zum Tode des infizierten Individuums führen können (54). Der Anteil an doppeltinfizierten Frauen bei den an AIDS verstorbenen Studienteilnehmerinnen könnte also auch deshalb so hoch sein, weil doppeltinfizierte Personen früher sterben. Ein Vergleich der Viruslast bei einfach- und doppeltinfizierten Studienteilnehmerinnen über die Zeit konnte dies – anders als bei vorher erwähnter Studie - allerdings nicht bestätigen (Geldmacher, unveröffentlichte Daten).

Der, in dieser Studie festgestellte, Anteil an rekombinanten Viren liegt mit 52% (einschließlich der Doppelinfektionen, die auch alle mindestens einen Rekombinanten beinhalten) so hoch wie bisher in noch keiner anderen Epidemie beschrieben. In Tansania selbst waren bis 1995 noch so gut wie keine rekombinanten Formen bekannt. Während der schon erwähnten Studie mit Kleinkindern aus Daressalaam 1997 wurden 15,5% Rekombinante identifiziert (137), 2001 wurde eine neue CRF der Subtypen C und D beschrieben (95) und von den Barfrauen aus Moshi 2003 waren immerhin 25% mit einem rekombinanten Virus infiziert (88). Der in den letzten Jahren drastisch gestiegene Anteil an rekombinanten Viren ist zum einen auf eine erhöhte Anzahl von HIV-1 Doppelinfektionen als Voraussetzung für Rekombinationsereignisse zurückzuführen. Zum anderen haben sich die Methoden zur Bestimmung von Rekombinanten und Mehrfachinfektionen weiterentwickelt. Mit älteren Methoden wie dem *V3-Loop* ELISA oder dem HMA konnten nur ein bis zwei relativ kurze Genomregionen untersucht werden, was eine Detektion von Rekombinanten unwahrscheinlich macht. Durch die heute eingesetzte Gesamtgenomsequenzierung und den MHA beispielsweise können rekombinante Formen mit wesentlich höherer Sensitivität identifiziert werden.

Bei näherer Betrachtung der auf der MHA-Analyse basierenden Rekombinationsmuster der rekombinanten Viren fällt auf, dass sich fast alle voneinander unterscheiden. Unter 21 Rekombinanten wurden insgesamt 13 verschiedene MHA-Subtypisierungsmuster gefunden. Drei von ihnen kamen in mindestens drei verschiedenen Isolaten vor, stellen daher potenzielle CRFs dar und sollten näher untersucht werden. Erst eine Gesamtgenomsequenzierung kann Aufschluß darüber geben, ob sich die genauen Rekombinationsmuster der einzelnen Isolate dennoch voneinander unterscheiden oder ob tatsächlich eine neue CRF vorliegt.

Vorangegangene Gesamtgenomsequenzierungen von 29 Isolaten aus der Allgemeinbevölkerung bestätigen das gehäufte Vorkommen von einmaligen Rekombinanten, URFs, in der Mbeya Region (5, 68). Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass diese Formen jeweils neu generiert und nur zu einem geringen Teil von einem Individuum zum nächsten übertragen wurden. Weiter lässt sich ableiten, dass es einen großen Anteil an Personen geben müsste, der mit mehr als einer Virusvariante infiziert ist und diese neuen rekombinanten Viren erzeugt. Diese Vermutung konnte durch die Subtypisierung mittels MHA, die einen Anteil an Doppelinfektionen von 20% enthüllte, bestätigt werden.

5.2.2 Longitudinale Auswertung der MHA_{ACD}-Ergebnisse

Der schon zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung (F0) hohe Anteil an Mehrfachinfektionen von 20% verdoppelte sich im Laufe des 21monatigen Analysezeitraums auf 40%. Dies macht die höhere Aussagekraft einer longitudinalen Analyse gegenüber einer cross-sektionalen Untersuchung der Prävalenz von HIV-1 Mehrfachinfektionen deutlich. Die Wahrscheinlichkeit einer Superinfektion änderte sich nicht signifikant, wenn ein „reiner“ Subtyp oder ein rekombinanter Virus vorlag. Auffällig war jedoch, dass, wann immer die Primärinfektion mit Subtyp D bzw. mit einem den Subtyp D beinhaltenden rekombinanten Virus erfolgte, bis auf eine Ausnahme, keine Superinfektion detektiert wurde. Die daraus abgeleitete Hypothese, eine Infektion mit einem Subtyp D könnte vor einer Superinfektion schützen, sollte zukünftig an größeren Probenzahlen genauer evaluiert werden. Dass sie durchaus ihre Berechtigung hat, zeigt eine Studie mit Prostituierten im Senegal. Nach 13jähriger

Beobachtungszeit kam man hier zu dem Ergebnis, dass eine bestehende HIV-2 Infektion das Risiko einer Superinfektion mit HIV-1 senken kann (91).

5.3 Auswertung der Detailanalyse einer Studienteilnehmerin mit HIV-1 Mehrfachinfektion

Die Untersuchung der Blutproben, die der Studienteilnehmerin während ihres letzten Lebensjahres in dreimonatigen Abständen entnommen wurden, enthüllte eine Mehrfachinfektion mit mindestens drei verschiedenen HIV-1 Varianten. Die Subtypisierung mittels MHA_{ACD} ergab eine AC-Doppelinfection in der *vpu*-Region. Durch Klonierung und Sequenzierung wurde dieses Ergebnis bestätigt, und es konnte zusätzlich zu Subtyp C und einigen rekombinanten Formen zwischen zwei verschiedenen Subtyp A Varianten unterschieden werden.

Die Gesamtheit aller drei Elternisolate konnte allerdings nur in Region 2 (*vpu*/GP120) identifiziert werden, der Region, in der die größte Komplexität gefunden wurde. Die hohe virale Diversität in dieser Region ist nichts Unerwartetes. Frühere Untersuchungen zeigen, dass sowohl in *vpu* als auch in Teilen von GP120 Rekombinationsereignisse überdurchschnittlich häufig sind. Solche Regionen werden auch als Rekombinations-*Hot Spots* bezeichnet (44, 108). Auch in anderen im Laufe von HISIS näher untersuchten HIV-1 Mehrfachinfektionen wurde eine unterschiedliche Komplexität der molekularen Formen abhängig von der Genomregion festgestellt (111). Es liegt die Vermutung nahe, dass in einem mehrfach infizierten Organismus durch Rekombinationsereignisse und die Selektion bestimmter Varianten einige Genomregionen eine größere Homogenität zeigen als andere.

In jedem Fall zeigte sich während dieser HIV-1 Infektion im Spätstadium eine hochkomplexe virale *quasispecies*, die auch Inter- und Intra-Subtyp-Rekombinante beinhaltet. Bei einer früheren Untersuchung der viralen Populationen in Männern, die sich ebenfalls in einem schon fortgeschrittenen bzw. AIDS-Stadium der HIV-1 Infektion befanden, beobachteten Delwart et al. die Tendenz zu einer vergleichsweise langsamen Virusevolution einhergehend mit einer stärkeren Homogenität zwischen den einzelnen viralen Varianten (36). Dieses Ergebnis konnte hier nicht bestätigt werden. Die Heterogenität der *quasispecies* veränderte sich in keiner der untersuchten

Genomregionen signifikant über den untersuchten Zeitraum von einem Jahr, während dessen sich der Zustand der Studienteilnehmerin von anfänglich gesund über die Entwicklung des Vollbildes von AIDS immer weiter verschlechterte, bis sie innerhalb weniger Monate an den Folgen der Immunschwäche verstarb. Allerdings konnte weder in Region 1 (*gag/pol*) noch in Region 3 (GP41/*nef*) der parenterale Subtyp C identifiziert werden. Dieser könnte also im Zuge von Selektion und damit einer gewissen Homogenisierung der *quasispecies* von den rekombinanten Varianten verdrängt worden sein. Leider liegen keine Daten vom frühen oder mittleren Infektionsstadium der Patientin vor, die einen Vergleich der Sequenzvariabilität zum Spätstadium erlauben würden.

Eine kürzlich erfolgte Analyse von HIV-1 Sequenzen aus unterschiedlichen Patientenpopulationen kommt zu dem Schluß, dass auch Ko-bzw. Superinfektionen mit dem gleichen Subtyp relativ weit verbreitet sein könnten (154). Dass sie aber zumindest möglich sind, zeigen frühere Berichte von mit Subtyp B infizierten Patienten (2, 90) und die Ergebnisse dieser Arbeit. In der Region 2 (*vpu/GP120*) wurden zwei verschiedene Varianten des Subtyps A identifiziert, die mehrere Rekombinante mit unterschiedlichen Rekombinationsmustern bildeten. Das Vorkommen von Intra-Subtyp-Superinfektionen zeigt, dass selbst die durch einen HIV-Stamm ausgelöste Immunantwort eine Infektion mit einem eng verwandten Virus nicht verhindern kann. Diese Erkenntnis hat weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung von protektiven Impfstoffen.

Ob sich die Patientin simultan oder nacheinander mit den drei HIV-1 Varianten infiziert hat, kann retrospektiv nicht mehr bestimmt werden. Allerdings war die Frau durch sexuellen Kontakt zu vielen verschiedenen Partnern über mehrere Jahre einem hohen Ansteckungsrisiko ausgesetzt, was eine Superinfektion durchaus wahrscheinlich macht. Schon bestätigt wurde ein anderer Fall einer Superinfektion aus derselben Kohorte. Hier hatte sich die Teilnehmerin erst während der Studie mit HIV-1 infiziert und innerhalb von 9 Monaten mit einer zweiten Variante superinfiziert (111).

Die vorliegende Analyse bestätigt das Vorkommen von HIV-1 Mehrfachinfektionen und zeigt, dass mehrere HIV-1 Varianten über einen längeren Zeitraum nebeneinander existieren können ohne dass eine Form dominiert. Dies ist vor allem dann wahrscheinlich, wenn das Immunsystem während der Entwicklung von AIDS

schwächer wird und nur noch einen geringen Selektionsdruck auf die sich entwickelnden molekularen Formen ausüben kann.

Die ebenfalls in dieser Arbeit beschriebene hohe Fluktuation der viralen Formen über den Analysezeitraum zeigt die Problematik einer cross-sektionalen Probenanalyse auf. Es wird deutlich, dass bei der Untersuchung nur eines Zeitpunktes, viele virale Varianten nicht identifiziert und damit Mehrfachinfektionen unter Umständen nicht erkannt werden. Hier erweist sich die longitudinale Analyse serieller Proben als bessere Methode für die möglichst vollständige Reproduktion der viralen Populationen und Detektion von Koinfektionen.

5.4 Schlußfolgerungen

1. Der Subtypisierungsassay MHA_{ACD} ist wahrscheinlich die einzige derzeit verfügbare Methode zur Bestimmung der Subtypenverteilung und der Prävalenz von Rekombinanten und Mehrfachinfektionen in großen Studienpopulationen in Ostafrika. Eine höhere Sensitivität, vor allem in der *env*-Region, könnte durch eine Überarbeitung des Tests auf der Grundlage aktueller Sequenzdaten einschließlich der Implementierung multipler Primerpaare für die PCR-Amplifikation erreicht werden.

2. Die untersuchte Hochrisikogruppe von Barfrauen im Südwesten von Tansania zeigte eine ähnliche Subtypenverteilung wie die Allgemeinbevölkerung der gleichen Region, aber signifikant mehr Doppelinfektionen und rekombinante Viren, deren Prävalenz also anscheinend mit dem Risikoverhalten eines Infizierten korreliert. Der Anteil der Doppelinfektionen (nicht aber der Anteil von Rekombinanten) korreliert auch mit der Dauer der Infektion bzw. mit dem Infektionsstadium. So ist die Prävalenz von Doppelinfektionen bei sich in einem Spätstadium der Infektion befindlichen Barfrauen mit 30% signifikant höher als bei Frauen im symptomlosen Stadium der HIV-Infektion (9%).

3. Der Anteil an rekombinanten Viren lag in dieser Studie mit 52% so hoch wie bisher noch in keiner anderen Epidemie beschrieben. Fast alle haben unterschiedliche Rekombinationsmuster und zählen damit zu den *Unique Recombinant Forms* (URFs). Eine genauere Charakterisierung potenzieller CRFs kann nur durch Gesamtgenomsequenzierung erfolgen. Der große Anteil von einmaligen

Rekombinanten impliziert als Grundlage für deren Bildung einen hohen Prozentsatz an Doppelinfektionen, der zu Beginn dieser Studie bei 20% lag und sich innerhalb von 21 Monaten verdoppelte.

4. Die aus den Ergebnissen der Subtypisierung abgeleitete Hypothese, die Erstinfektion mit einem Subtyp D schützt vor einer Superinfektion sollte vor allem im Hinblick auf die Entwicklung eines protektiven Impfstoffs in der Zukunft genauer untersucht werden.

5. Die bei der, im Detail untersuchten, Studienteilnehmerin durch den MHA_{ACD} indizierte AC Doppelinfektion konnte durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt und durch die Unterscheidung zweier Varianten des Subtyps A zu einer Tripleinfektion erweitert werden.

6. In allen drei untersuchten Genomregionen wurde eine komplexe virale *quasispecies* mit vielen Inter- und Intra-Subtyp-Rekombinanten gefunden. Die Anteile der verschiedenen molekularen Formen fluktuierten sehr stark über den Untersuchungszeitraum von einem Jahr. Zur möglichst vollständigen Erfassung aller viralen Varianten und zur zuverlässigen Detektion von Koinfektionen in der Zukunft sollte daher die longitudinale Analyse einer cross-sektionalen Untersuchung vorgezogen werden.

7. Die Wahl der Primer kann zur Selektion bestimmter Virusvarianten während der PCR-Amplifikation führen und damit auch die Detektion von Doppelinfektionen verhindern. Durch den PCR Ansatz mit multiplen Primern werden aufgrund der schnellen Evolution des HIV-Genoms auftretende Mismatches in der Basenpaarung zwischen Ziel- und Primersequenz minimiert. Die Methode erhöht die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Doppelinfektionen im Vergleich zu einer konventionellen PCR und kann durch den Einsatz weiterer Primerkombinationen noch sensitiver gemacht werden.

8. Die genaue Charakterisierung der in einer Region zirkulierenden molekularen Formen und der Entwicklung der viralen Populationen in einem infizierten Individuum liefern, vor allem in Korrelation mit entsprechenden Immunantworten, wertvolle Informationen für die Entwicklung eines subtypenübergreifenden protektiven Impfstoffes.

6 Zusammenfassung

Die hohe genetische Variabilität von HIV stellt ein großes biologisches Hindernis für die Entwicklung erfolgreicher Medikamente und Impfstoffe dar. Im Laufe seiner Evolution hat HIV eine Vielzahl von Untergruppen und Subtypen entwickelt, die in unterschiedlichen geographischen Regionen und Bevölkerungsgruppen eigenständige Epidemien geschaffen haben, aus denen sich die weltweite Pandemie zusammensetzt.

Die hohe Evolutionsrate von HIV wird verursacht durch seine Fähigkeit, schnell zu mutieren, zu rekombinieren und sich mit einer sehr kurzen Generationszeit zu replizieren. Während die kontinuierliche Akkumulation von Punktmutationen eher zu allmählichen Veränderungen der biologischen Eigenschaften des Virus führt, können durch Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Virusisolaten plötzlich größere Genomabschnitte ausgetauscht und damit eventuell fittere Varianten generiert und selektiert werden. Eine rasche Bildung von Fluchtmutanten oder Resistenzen gegen antiretrovirale Therapie sind die Konsequenz. Voraussetzung für die Bildung derartiger Mosaikgenome ist zum einen die zeitgleiche Infektion einer Zielzelle mit mehreren Virionen und zum anderen die Koinfektion eines Individuums mit mehr als einer HIV-Variante.

Koinfektionen und Rekombinationen mit verschiedenen HIV-1 Subtypen sind besonders wahrscheinlich in Regionen, in denen mehrere Virusvarianten koizirkulieren, wie in Tansania, wo man die HIV-1 Subtypen A, C und D nebeneinander findet. Zur Untersuchung der genauen Subtypenverteilung mit besonderem Fokus auf rekombinante Formen und Mehrfachinfektionen wurde in der Region Mbeya im Südwesten Tansanias eine Hochrisikokohorte von 600 Barfrauen gebildet, die alle drei Monate über einen Zeitraum von vier Jahren nachuntersucht wurden (HISIS-Studie). Die initiale HIV-1 Prävalenz in dieser Kohorte betrug 67,8%.

75 zufällig aus dieser Studie ausgewählte HIV-1 positive Frauen wurden in dreimonatigen Intervallen mit dem Multiregion-Hybridisation-Assay (MHA_{ACD}) auf ihren HIV-1 Subtyp hin getestet. Dieser sensitive und durchsatzstarke Subtypisierungstest beruht auf dem Prinzip einer *real-time* PCR mit

subtypenspezifischen Hybridisierungssonden, die an die HIV-DNA in fünf Genomregionen binden. Neben reinen Subtypen kann der MHA_{ACD} auch rekombinante Viren und Doppelinfectionen mit hoher Vorhersagekraft nachweisen. Die Verteilung der reinen (nichtrekombinanten) Subtypen zu Beginn der Studie wurde dominiert von C mit 34%, gefolgt von A mit 9% bzw. D mit nur 5%. Damit wird der größere Einfluß der südlichen Nachbarn, in denen ebenfalls der Subtyp C überwiegt, auf die Region Mbeya im Vergleich zu den nördlich angrenzenden vor allem von Subtyp A und D dominierten Staaten deutlich. 52% aller Infektionen sind entweder verursacht durch rekombinante Viren (32%) oder Mehrfachinfektionen mit Beteiligung von Rekombinanten (20%). Dieser Prozentsatz liegt sehr viel höher als in der Allgemeinbevölkerung dieser Region und impliziert daher eine Korrelation zwischen dem Risikoverhalten der Infizierten und der Wahrscheinlichkeit einer HIV-1 Mehrfachinfektion und dem Auftreten von rekombinanten Formen. Die Mehrheit der Koinfektionen schienen nicht auf einer simultanen, sondern einer sequentiellen (Superinfektion) Transmission verschiedener Virusvarianten zu beruhen, was durch den Vergleich zweier Gruppen von Barfrauen belegt wird. Erstere befanden sich in einem mittleren Infektionsstadium der HIV-1 Infektion und wiesen eine signifikant geringere Prävalenz an Mehrfachinfektionen (9%) auf als die zweite Gruppe der Teilnehmerinnen, die sich zu Beginn der Studie schon in einem Spätstadium bzw. im AIDS-Stadium befand und mit 30% einen deutlich höheren Anteil an Mehrfachinfektionen zeigte.

Aus den durch den MHA_{ACD} detektierten Mehrfachinfektionen wurde eine Studienteilnehmerin mit einer fortgeschrittenen HIV-1 Infektion zur detaillierten Analyse der viralen Populationen ausgewählt. Sie entwickelte innerhalb von 12 Monaten nach Eintritt in die Studie AIDS definierende Symptome und verstarb kurz darauf an den Folgen der Immunschwäche. Der an fünf aufeinanderfolgenden Zeitpunkten (0, 3, 6, 9, 12 Monate) durchgeführte MHA_{ACD}-Test enthüllte eine AC-Doppelinfection in der *vpu*-Region. Diese konnte durch die Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von drei Genomfragmenten (*gag/pol*, *vpu/GP120*, *GP41/nef*) bestätigt werden. Eine detaillierte phylogenetische Sequenzanalyse der Region 2 (*vpu/GP120*) enthüllte eine zweite A-Variante, weshalb von einer Dreifachinfektion der Patientin ausgegangen werden kann. Zusätzlich wurden in allen drei untersuchten Genomregionen eine Reihe von aus den Elternformen gebildeten rekombinanten Viren

identifiziert. Die komplexeste virale *quasispecies* mit mindestens acht verschiedenen molekularen Formen wurde in der Region 2 (*vpu/GP120*) gefunden. Die Anteile der verschiedenen viralen Varianten in den analysierten Regionen fluktierten sehr stark über den Untersuchungszeitraum von einem Jahr, weshalb eine longitudinale einer cross-sektionalen Analyse zur zuverlässigen Detektion von Koinfektionen vorzuziehen ist. Eine eindeutige Tendenz zu stärkerer Homogenisierung bzw. Diversifizierung der *quasispecies* mit der Manifestierung von AIDS und damit sinkendem Immundruck konnte nicht festgestellt werden.

Für die Amplifikation der drei untersuchten Genomfragmente im Rahmen einer verschachtelten PCR wurden jeweils vier verschiedene Primerkombinationen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz multipler Primerpaare eine Selektion bestimmter Virusvarianten während der PCR verringern und damit die Wahrscheinlichkeit der Detektion einer Mehrfachinfektion im Vergleich zu einer konventionellen PCR erhöhen kann. Eine weitere Sensitivitätssteigerung der Methodik wäre zukünftig durch zusätzliche Primerpaare denkbar.

Die detaillierte Untersuchung der viralen Formen spielt eine bedeutende Rolle vor allem im Hinblick auf zukünftige Studien zur Evaluierung von HIV-Vakzinen, wie sie unter anderem in der Region Mbeya in Tansania stattfinden werden. Ein unvollständiges Bild der zirkulierenden HIV-Varianten kann zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse solcher Studien und in der Folge zu einer falschen Einschätzung der Wirksamkeit von Impfstoffkandidaten führen.

7 Literaturverzeichnis

1. 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:305-8.
2. **Altfeld, M., T. M. Allen, X. G. Yu, M. N. Johnston, D. Agrawal, B. T. Korber, D. C. Montefiori, D. H. O'Connor, B. T. Davis, P. K. Lee, E. L. Maier, J. Harlow, P. J. Goulder, C. Brander, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker.** 2002. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* **420**:434-9.
3. **An, W., and A. Telesnitsky.** 2002. HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Rev* **4**:195-212.
4. **Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson, G. Biberfeld, and J. Albert.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**:3286-93.
5. **Arroyo, M. A., M. Hoelscher, E. Sanders-Buell, K. H. Herbing, E. Samky, L. Maboko, O. Hoffmann, M. R. Robb, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 2004. HIV type 1 subtypes among blood donors in the Mbeya region of southwest Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:895-901.
6. **Artenstein, A. W., T. C. VanCott, J. R. Mascola, J. K. Carr, P. A. Hegerich, J. Gaywee, E. Sanders-Buell, M. L. Robb, D. E. Dayhoff, S. Thitvichianlert, and et al.** 1995. Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* **171**:805-10.
7. **Bailes, E., F. Gao, F. Bibollet-Ruche, V. Courgnaud, M. Peeters, P. A. Marx, B. H. Hahn, and P. M. Sharp.** 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**:1713.
8. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic

- retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
9. **Bebenek, K., J. Abbotts, J. D. Roberts, S. H. Wilson, and T. A. Kunkel.** 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **264**:16948-56.
 10. **Becker-Pergola, G., J. L. Mellquist, L. Guay, F. Mmiro, C. Ndugwa, P. Kataaha, J. B. Jackson, and S. H. Eshleman.** 2000. Identification of diverse HIV type 1 subtypes and dual HIV type 1 infection in pregnant Ugandan women. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1099-104.
 11. **Bernard, P., and M. Couturier.** 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**:735-45.
 12. **Bernard, P., P. Gabant, E. M. Bahassi, and M. Couturier.** 1994. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**:71-4.
 13. **Bernard, P., K. E. Kezdy, L. Van Melderren, J. Steyaert, L. Wyns, M. L. Pato, P. N. Higgins, and M. Couturier.** 1993. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* **234**:534-41.
 14. **Blackard, J. T., D. E. Cohen, and K. H. Mayer.** 2002. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* **34**:1108-14.
 15. **Blackard, J. T., B. Renjifo, B. Chaplin, G. Msamanga, W. Fawzi, and M. Essex.** 2000. Diversity of the HIV-1 long terminal repeat following mother-to-child transmission. *Virology* **274**:402-11.
 16. **Boyer, J. C., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1992. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6919-23.
 17. **Boyum, A.** 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* **5**:9-15.

18. **Brennan, C. A., J. K. Lund, A. Golden, J. Yamaguchi, A. S. Vallari, J. F. Phillips, P. K. Kataaha, J. B. Jackson, and S. G. Devare.** 1997. Serologic and phylogenetic characterization of HIV-1 subtypes in Uganda. *Aids* **11**:1823-32.
19. **Brodine, S. K., M. J. Starkey, R. A. Shaffer, S. I. Ito, S. A. Tasker, A. J. Barile, C. L. Tamminga, K. T. Stephan, N. E. Aronson, S. L. Fraser, M. R. Wallace, S. A. Wegner, J. R. Mascola, and F. E. McCutchan.** 2003. Diverse HIV-1 subtypes and clinical, laboratory and behavioral factors in a recently infected US military cohort. *Aids* **17**:2521-7.
20. **Butto, S., C. Argentini, A. M. Mazzella, M. P. Iannotti, P. Leone, A. Nicolosi, and G. Rezza.** 1997. Dual infection with different strains of the same HIV-1 subtype. *Aids* **11**:694-6.
21. **Buve, A.** 2002. HIV epidemics in Africa: what explains the variations in HIV prevalence? *IUBMB Life* **53**:193-5.
22. **Buve, A., M. Carael, R. J. Hayes, B. Auvert, B. Ferry, N. J. Robinson, S. Anagonou, L. Kanhonou, M. Laourou, S. Abega, E. Akam, L. Zekeng, J. Chege, M. Kahindo, N. Rutenberg, F. Kaona, R. Musonda, T. Sukwa, L. Morison, H. A. Weiss, and M. Laga.** 2001. The multicentre study on factors determining the differential spread of HIV in four African cities: summary and conclusions. *Aids* **15 Suppl 4**:S127-31.
23. **Buve, A., E. Lagarde, M. Carael, N. Rutenberg, B. Ferry, J. R. Glynn, M. Laourou, E. Akam, J. Chege, and T. Sukwa.** 2001. Interpreting sexual behaviour data: validity issues in the multicentre study on factors determining the differential spread of HIV in four African cities. *Aids* **15 Suppl 4**:S117-26.
24. **Cardullo, R. A., S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, and D. E. Wolf.** 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8790-4.
25. **Carr, J. K., M. Avila, M. Gomez Carrillo, H. Salomon, J. Hierholzer, V. Watanaveeradej, M. A. Pando, M. Negrete, K. L. Russell, J. Sanchez, D. L. Birx, R. Andrade, J. Vinales, and F. E. McCutchan.** 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *Aids* **15**:F41-7.

26. **Carr, J. K., M. O. Salminen, J. Albert, E. Sanders-Buell, D. Gotte, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 1998. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* **247**:22-31.
27. **Carr, J. K., M. O. Salminen, C. Koch, D. Gotte, A. W. Artenstein, P. A. Hegerich, D. St Louis, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1996. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* **70**:5935-43.
28. **CDC.** 2003. Centers for Disease Control & Prevention, National Center for HIV, STD and TB Prevention, Divisions of HIV/AIDS Prevention, Atlanta, USA.
29. **Chapman, L. E.** 2003. Xenotransplantation: public health risks--patient vs. society in an emerging field. *Curr Top Microbiol Immunol* **278**:23-45.
30. **Chen, Z., A. Luckay, D. L. Sodora, P. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J. M. Kanu, R. F. Sadek, J. Yee, D. D. Ho, L. Zhang, and P. A. Marx.** 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* **71**:3953-60.
31. **Chen, Z., P. Telfier, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx.** 1996. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol* **70**:3617-27.
32. **Chitnis, A., D. Rawls, and J. Moore.** 2000. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:5-8.
33. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-6.

34. **Clumeck, N., F. Mascart-Lemone, J. de Maubeuge, D. Brenez, and L. Marcelis.** 1983. Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans. *Lancet* **1**:642.
35. **Delgado, E., M. M. Thomson, M. L. Villahermosa, M. Sierra, A. Ocampo, C. Miralles, R. Rodriguez-Perez, J. Diz-Aren, R. Ojea-de Castro, E. Losada, M. T. Cuevas, E. Vazquez-de Parga, R. Carmona, L. Perez-Alvarez, L. Medrano, L. Cuevas, J. A. Taboada, and R. Najera.** 2002. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:536-43.
36. **Delwart, E. L., H. Pan, H. W. Sheppard, D. Wolpert, A. U. Neumann, B. Korber, and J. I. Mullins.** 1997. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* **71**:7498-508.
37. **Devico, A. L., T. R. Fouts, M. T. Shata, R. Kamin-Lewis, G. K. Lewis, and D. M. Hone.** 2002. Development of an oral prime-boost strategy to elicit broadly neutralizing antibodies against HIV-1. *Vaccine* **20**:1968-1974.
38. **Diaz, R. S., E. C. Sabino, A. Mayer, J. W. Mosley, and M. P. Busch.** 1995. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. *J Virol* **69**:3273-81.
39. **Dowling, W. E., B. Kim, C. J. Mason, K. M. Wasunna, U. Alam, L. Elson, D. L. Birx, M. L. Robb, F. E. McCutchan, and J. K. Carr.** 2002. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *Aids* **16**:1809-20.
40. **Eigen, M.** 1993. Viral quasispecies. *Sci Am* **269**:42-9.
41. **Felsenstein, J.** 1992. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 3.52c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, Seattle.
42. **Förster, V. T.** 1948. Zwischenmolekulare Energie-wanderung und Fluoreszenz, p. 55-75, *Annals of Physics*, vol. 2, Leipzig.

43. **Fultz, P. N., L. Yue, Q. Wei, and M. Girard.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 intersubtype (B/E) recombination in a superinfected chimpanzee. *J. Virol.* **71**:7990-7995.
44. **Galetto, R., A. Moumen, V. Giacomoni, M. Veron, P. Charneau, and M. Negroni.** 2004. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo. *J Biol Chem* **279**:36625-32.
45. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-3.
46. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-7.
47. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-41.
48. **Gao, F., D. L. Robertson, C. D. Carruthers, Y. Li, E. Bailes, L. G. Kostrikis, M. O. Salminen, F. Bibollet-Ruche, M. Peeters, D. D. Ho, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1998. An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* **72**:10234-41.
49. **Gao, F., D. L. Robertson, S. G. Morrison, H. Hui, S. Craig, J. Decker, P. N. Fultz, M. Girard, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and P. M. Sharp.** 1996. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* **70**:7013-29.
50. **Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho, G. M. Shaw, and et al.** 1994. Genetic

- diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* **68**:7433-47.
51. **Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**:495-9.
52. **Gibellini, D., F. Vitone, P. Schiavone, C. Ponti, M. La Placa, and M. C. Re.** 2004. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique. *J Clin Virol* **29**:282-9.
53. **Gilbert, P. B., I. W. McKeague, G. Eisen, C. Mullins, N. A. Gueye, S. Mboup, and P. J. Kanki.** 2003. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* **22**:573-93.
54. **Gottlieb, G. S., D. C. Nickle, M. A. Jensen, K. G. Wong, J. Grobler, F. Li, S. L. Liu, C. Rademeyer, G. H. Learn, S. S. Karim, C. Williamson, L. Corey, J. B. Margolick, and J. I. Mullins.** 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* **363**:619-22.
55. **Gu, Z., Q. Gao, E. A. Faust, and M. A. Wainberg.** 1995. Possible involvement of cell fusion and viral recombination in generation of human immunodeficiency virus variants that display dual resistance to AZT and 3TC. *J Gen Virol* **76 (Pt 10)**:2601-5.
56. **Gurtler, L. G., L. Zekeng, J. M. Tsague, A. van Brunn, E. Afane Ze, J. Eberle, and L. Kaptue.** 1996. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* **11**:195-202.
57. **Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-14.
58. **Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker.** 1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:585-92.

59. **Harris, M. E., D. Serwadda, N. Sewankambo, B. Kim, G. Kigozi, N. Kiwanuka, J. B. Phillips, F. Wabwire, M. Meehen, T. Lutalo, J. R. Lane, R. Merling, R. Gray, M. Wawer, D. L. Birx, M. L. Robb, and F. E. McCutchan.** 2002. Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:1281-90.
60. **Herbinger, K.-H., Gerhardt, M, Piyasirisilp, S, Mloka, D, Arroyo, M, Hoffmann, O, Maboko, L, Birx, DL, Mmbando, D, McCutchan, FE and Hoelscher, M.** 2005. Frequency of HIV-1 multiple infection and HIV diversity: analysis of low and high risk populations in Mbeya region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **submitted for publication**.
61. **Hierholzer, J., S. Montano, M. Hoelscher, M. Negrete, M. Hierholzer, M. M. Avila, M. G. Carrillo, J. C. Russi, J. Vinales, A. Alava, M. E. Acosta, A. Gianella, R. Andrade, J. L. Sanchez, G. Carrion, K. Russell, M. Robb, D. Birx, F. McCutchan, and J. K. Carr.** 2002. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:1339-50.
62. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**:413-7.
63. **Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**:1026-30.
64. **Hillis, D., and J. Bull.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic trees. *Syst Bil* **42**:182-192.
65. **Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**:389-92.
66. **Hoelscher, M.** 2003. The Mbeya Medical Research Programme (MMRP).
67. **Hoelscher, M., W. E. Dowling, E. Sanders-Buell, J. K. Carr, M. E. Harris, A. Thomschke, M. L. Robb, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 2002.

- Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. *Aids* **16**:2055-64.
68. **Hoelscher, M., B. Kim, L. Maboko, F. Mhalu, F. von Sonnenburg, D. L. Birx, and F. E. McCutchan.** 2001. High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania. *Aids* **15**:1461-70.
69. **Hoffmann, O., B. Zaba, B. Wolff, E. Sanga, L. Maboko, D. Mmbando, F. von Sonnenburg, and M. Hoelscher.** 2004. Methodological lessons from a cohort study of high risk women in Tanzania. *Sex Transm Infect* **80 Suppl 2**:ii69-73.
70. **Howard, T. M., and S. Rasheed.** 1996. Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new HIV type 1 subtype A strain from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:1413-25.
71. **Howell, R. M., J. E. Fitzgibbon, M. Noe, Z. J. Ren, D. J. Gocke, T. A. Schwartz, and D. T. Dubin.** 1991. In vivo sequence variation of the human immunodeficiency virus type 1 env gene: evidence for recombination among variants found in a single individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**:869-76.
72. **Hu, W. S., and H. M. Temin.** 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-33.
73. **Hurtenbach, U., and G. M. Shearer.** 1982. Germ cell-induced immune suppression in mice. Effect of inoculation of syngeneic spermatozoa on cell-mediated immune responses. *J Exp Med* **155**:1719-29.
74. **IAVI**, posting date. International Aids Vaccine Initiative (www.iavi.org), homepage. [Online.]
75. **IAVI.** 2005. VAX, a IAVI report bulletin, 2004 - year in review.
76. **IAVI.** 2004. VAX, a IAVI report bulletin, September 2004.
77. **Iversen, A. K., G. H. Learn, L. Fugger, J. Gerstoft, J. I. Mullins, and P. Skinhoj.** 1999. Presence of multiple HIV subtypes and a high frequency of subtype chimeric viruses in heterosexually infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* **22**:325-32.

78. **Jaffe, H. W., D. J. Bregman, and R. M. Selik.** 1983. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis* **148**:339-45.
79. **Janini, L. M., D. Pieniazek, J. M. Peralta, M. Schechter, A. Tanuri, A. C. Vicente, N. dela Torre, N. J. Pieniazek, C. C. Luo, M. L. Kalish, G. Schochetman, and M. A. Rayfield.** 1996. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. *Virus Genes* **13**:69-81.
80. **Janssens, W., A. Buve, and J. N. Nkengasong.** 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *Aids* **11**:705-12.
81. **Jetzt, A. E., H. Yu, G. J. Klarmann, Y. Ron, B. D. Preston, and J. P. Dougherty.** 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**:1234-40.
82. **Jordan-Harder, B., L. Maboko, D. Mmbando, G. Riedner, E. Nagele, J. Harder, V. Kuchen, A. Kilian, R. Korte, and F. V. Sonnenburg.** 2004. Thirteen years HIV-1 sentinel surveillance and indicators for behavioural change suggest impact of programme activities in south-west Tanzania. *Aids* **18**:287-94.
83. **Jost, S., M. C. Bernard, L. Kaiser, S. Yerly, B. Hirschel, A. Samri, B. Autran, L. E. Goh, and L. Perrin.** 2002. A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med* **347**:731-6.
84. **Jung, A., R. Maier, J. P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**:144.
85. **Kim, J. H., R. J. McLinden, J. D. Mosca, D. S. Burke, R. N. Boswell, D. L. Birx, and R. R. Redfield.** 1996. Transcriptional effects of superinfection in HIV chronically infected T cells: studies in dually infected clones. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **12**:329-42.
86. **Kim, J. H., J. D. Mosca, M. T. Vahey, R. J. McLinden, D. S. Burke, and R. R. Redfield.** 1993. Consequences of human immunodeficiency virus type 1 superinfection of chronically infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:875-82.

87. **Kiwelu, I. E., H. L. Nakkestad, J. Shao, and M. A. Sommerfelt.** 2000. Evidence of subtype B-like sequences in the V3 loop region of human immunodeficiency virus type 1 in Kilimanjaro, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1191-5.
88. **Kiwelu, I. E., B. Renjifo, B. Chaplin, N. Sam, W. M. Nkya, J. Shao, S. Kapiga, and M. Essex.** 2003. HIV type 1 subtypes among bar and hotel workers in Moshi, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:57-64.
89. **Klein, M. R., and F. Miedema.** 1995. Long-term survivors of HIV-1 infection. *Trends Microbiol* **3**:386-91.
90. **Koelsch, K. K., D. M. Smith, S. J. Little, C. C. Ignacio, T. R. Macaranas, A. J. Brown, C. J. Petropoulos, D. D. Richman, and J. K. Wong.** 2003. Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *Aids* **17**:F11-6.
91. **Kokkotou, E. G., J. L. Sankale, I. Mani, A. Gueye-Ndiaye, D. Schwartz, M. E. Essex, S. Mboup, and P. J. Kanki.** 2000. In vitro correlates of HIV-2-mediated HIV-1 protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6797-802.
92. **Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya.** 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**:1789-96.
93. **Korber, B., S. Wolinsky, B. Haynes, K. Kunstman, R. Levy, M. Furtado, P. Otto, and G. Myers.** 1992. HIV-1 inpatient sequence diversity in the immunogenic V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:1461-5.
94. **Kostrikis, L. G., E. Bagdades, Y. Cao, L. Zhang, D. Dimitriou, and D. D. Ho.** 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* **69**:6122-30.
95. **Koulinska, I. N., T. Ndung'u, D. Mwakagile, G. Msamanga, C. Kagoma, W. Fawzi, M. Essex, and B. Renjifo.** 2001. A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:423-31.

96. **Kuiken, C., G. Zwart, E. Baan, R. Coutinho, J. Hoek, and J. Goudsmit.** 1993. Increasing Antigenic and Genetic Diversity of the V3 Variable Domain of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Protein in the Course of the AIDS Epidemic. *PNAS* **90**:9061-9065.
97. **Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**:1244-5.
98. **Kyaw-Tanner, M. T., W. K. Greene, H.-S. Park, and W. F. Robinson.** 1994. The induction of in vivo superinfection and recombination using feline immunodeficiency virus as the model. *Arch.Virol.* **138**:261-271.
99. **Lakowicz, J. R.** 1983. Chapter 10. Energy Transfer, p. 303-339, *Principles of Fluorescent Spectroscopy*. Plenum Press, New York.
100. **Laukkanen, T., J. K. Carr, W. Janssens, K. Liitsola, D. Gotte, F. E. McCutchan, E. Op de Coul, M. Cornelissen, L. Heyndrickx, G. van der Groen, and M. O. Salminen.** 2000. Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *Virology* **269**:95-104.
101. **Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance.** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**:1112.
102. **Lee, C. N., M. Y. Chen, H. S. Lin, M. C. Lee, C. C. Luo, S. J. Twu, R. Y. Lin, and C. Y. Chuang.** 1998. HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:807-9.
103. **Li, W. H., M. Tanimura, and P. M. Sharp.** 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* **5**:313-30.
104. **Liitsola, K., I. Tashkinova, T. Laukkanen, G. Korovina, T. Smolskaja, O. Momot, N. Mashkilleyson, S. Chaplinskas, H. Brummer-Korvenkontio, J. Vanhatalo, P. Leinikki, and M. O. Salminen.** 1998. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *Aids* **12**:1907-19.
105. **Louwagie, J., W. Janssens, J. Mascola, L. Heyndrickx, P. Hegerich, G. van der Groen, F. E. McCutchan, and D. S. Burke.** 1995. Genetic diversity of the

- envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J Virol* **69**:263-71.
106. **Lukashov, V. V., R. Huismans, A. G. Rakhmanova, Z. N. Lisitsina, N. A. Akhtyrskaya, N. N. Vlasov, O. B. Melnick, and J. Goudsmit.** 1999. Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:1577-83.
107. **Maciukenas, S.** 1994. Treetool, 2.0.2. Ribosomal DNA Database Project. University of Illinois Board of Trustees, Urbana, IL.
108. **Magiorkinis, G., D. Paraskevis, A. M. Vandamme, E. Magiorkinis, V. Sypsa, and A. Hatzakis.** 2003. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* **84**:2715-22.
109. **Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, and et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**:1587-90.
110. **McCutchan, F. E.** 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *Aids* **14 Suppl 3**:S31-44.
111. **McCutchan FE, H. M., Tovanabutra S, Piyasirisilp S, Sanders-Buell E, Ramos G, Jagodzinski L, Polonis V, Maboko L, Hoffmann O, von Sonnenburg F, Robb M, Birx DL.** 2005. First in-depth analysis of a heterosexually acquired HIV-1 superinfection: evolution, temporal fluctuation, and inter-compartment dynamics from the window period through 30 months post infection. *Journal of Virology* **accepted**.
112. **McCutchan, F. H., M; Wolfe, ND; Kijak, GH; Carr, JK; Robb, ML; Birx, DL.** 2003. Presented at the Keystone Symposia, Banff.
113. **Mhalu, F., U. Bredberg-Raden, E. Mbena, K. Pallangyo, J. Kiango, R. Mbise, K. Nyamuryekunge, and G. Biberfeld.** 1987. Prevalence of HIV infection in healthy subjects and groups of patients in Tanzania. *Aids* **1**:217-21.
114. **Michael, N. L., G. Chang, P. K. Ehrenberg, M. T. Vahey, and R. R. Redfield.** 1993. HIV-1 proviral genotypes from the peripheral blood

- mononuclear cells of an infected patient are differentially represented in expressed sequences. *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**:1073-85.
115. **Montavon, C., F. Bibollet-Ruche, D. Robertson, B. Koumare, C. Mulanga, E. Esu-Williams, C. Toure, S. Mboup, E. Saman, E. Delaporte, and M. Peeters.** 1999. The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various West African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:1707-12.
116. **Montavon, C., L. Vergne, A. Bourgeois, E. Mpoudi-Ngole, G. Malonga-Mouellet, C. Butel, C. Toure-Kane, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:231-6.
117. **Morison, L., A. Buve, L. Zekeng, L. Heyndrickx, S. Anagonou, R. Musonda, M. Kahindo, H. A. Weiss, R. J. Hayes, M. Laga, W. Janssens, and G. van der Groen.** 2001. HIV-1 subtypes and the HIV epidemics in four cities in sub-Saharan Africa. *Aids* **15 Suppl 4**:S109-16.
118. **Moutouh, L., J. Corbeil, and D. D. Richman.** 1996. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6106-11.
119. **Murphy, E., B. Korber, M. C. Georges-Courbot, B. You, A. Pinter, D. Cook, M. P. Kieny, A. Georges, C. Mathiot, F. Barre-Sinoussi, and et al.** 1993. Diversity of V3 region sequences of human immunodeficiency viruses type 1 from the central African Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:997-1006.
120. **Nahmias, A. J., J. Weiss, X. Yao, F. Lee, R. Kodosi, M. Schanfield, T. Matthews, D. Bolognesi, D. Durack, A. Motulsky, and et al.** 1986. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* **1**:1279-80.
121. **Nasioulas, G., D. Paraskevis, E. Magiorkinis, M. Theodoridou, and A. Hatzakis.** 1999. Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1

- subtype I: evidence of A/G/I recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**:745-58.
122. **Nkengasong, J. N., L. Kestens, P. D. Ghys, S. Koblavi-Deme, R. A. Otten, C. Bile, C. Maurice, M. Kalou, M. Laga, S. Z. Wiktor, and A. E. Greenberg.** 2000. Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 and type 2: impact on HIV type 1 viral load and immune activation markers in HIV-seropositive female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1371-8.
123. **Norrgren, H., Z. da Silva, A. Biague, S. Andersson, and G. Biberfeld.** 2003. Clinical progression in early and late stages of disease in a cohort of individuals infected with human immunodeficiency virus-2 in Guinea-Bissau. *Scand J Infect Dis* **35**:265-72.
124. **Otten, R. A., D. L. Ellenberger, D. R. Adams, C. A. Fridlund, E. Jackson, D. Pieniazek, and M. A. Rayfield.** 1999. Identification of a window period for susceptibility to dual infection with two distinct human immunodeficiency virus type 2 isolates in a *Macaca nemestrina* (pig-tailed macaque) model. *J Infect Dis* **180**:673-84.
125. **Peeters, M. (ed.).** 2000. *Recombinant HIV Sequences: Their Role in the Global Epidemic.* Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.
126. **Peeters, M., G. M. Gershy-Damet, K. Fransen, K. Koffi, M. Coulibaly, E. Delaporte, P. Piot, and G. van der Groen.** 1992. Virological and polymerase chain reaction studies of HIV-1/HIV-2 dual infection in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**:339-40.
127. **Peeters, M., A. Gueye, S. Mboup, F. Bibollet-Ruche, E. Ekaza, C. Mulanga, R. Ouedrago, R. Gandji, P. Mpele, G. Dibanga, B. Koumare, M. Saidou, E. Esu-Williams, J. P. Lombart, W. Badombena, N. Luo, M. Vanden Haesevelde, and E. Delaporte.** 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* **11**:493-8.
128. **Peeters, M., F. Liegeois, N. Torimiro, A. Bourgeois, E. Mpoudi, L. Vergne, E. Saman, E. Delaporte, and S. Saragosti.** 1999. Characterization of a highly

- replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* **73**:7368-75.
129. **Pinto, L. A., J. Sullivan, J. A. Berzofsky, M. Clerici, H. A. Kessler, A. L. Landay, and G. M. Shearer.** 1995. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J Clin Invest* **96**:867-76.
130. **Piot, P., T. C. Quinn, H. Taelman, F. M. Feinsod, K. B. Minlangu, O. Wobin, N. Mbendi, P. Mazebo, K. Ndangi, W. Stevens, and et al.** 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* **2**:65-9.
131. **Piyasirisilp, S., F. E. McCutchan, J. K. Carr, E. Sanders-Buell, W. Liu, J. Chen, R. Wagner, H. Wolf, Y. Shao, S. Lai, C. Beyrer, and X. F. Yu.** 2000. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol* **74**:11286-95.
132. **Pollakis, G., A. Abebe, A. Kliphuis, T. F. De Wit, B. Fisseha, B. Tegbaru, G. Tesfaye, H. Negassa, Y. Mengistu, A. L. Fontanet, M. Cornelissen, and J. Goudsmit.** 2003. Recombination of HIV type 1C (C'/C'') in Ethiopia: possible link of EthHIV-1C' to subtype C sequences from the high-prevalence epidemics in India and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:999-1008.
133. **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* **180**:1116-21.
134. **Quinn, T. C., J. M. Mann, J. W. Curran, and P. Piot.** 2001. AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm. 1986. *Bull World Health Organ* **79**:1159-67.
135. **Ramos, A., D. J. Hu, L. Nguyen, K. O. Phan, S. Vanichseni, N. Promadej, K. Choopanya, M. Callahan, N. L. Young, J. McNicholl, T. D. Mastro, T. M. Folks, and S. Subbarao.** 2002. Intersubtype human immunodeficiency virus

- type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol* **76**:7444-52.
136. **Ramos, A., A. Tanuri, M. Schechter, M. A. Rayfield, D. J. Hu, M. C. Cabral, C. I. Bandea, J. Baggs, and D. Pieniazek.** 1999. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. *Emerg Infect Dis* **5**:65-74.
137. **Renjifo, B., B. Chaplin, D. Mwakagile, P. Shah, F. Vannberg, G. Msamanga, D. Hunter, W. Fawzi, and M. Essex.** 1998. Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:635-8.
138. **Riedner, G., M. Rusizoka, O. Hoffmann, F. Nichombe, E. Lyamuya, D. Mmbando, L. Maboko, P. Hay, J. Todd, R. Hayes, M. Hoelscher, and H. Grosskurth.** 2003. Baseline survey of sexually transmitted infections in a cohort of female bar workers in Mbeya Region, Tanzania. *Sex Transm Infect* **79**:382-7.
139. **Robert-Koch-Institut.** 2004. *Epidemiologisches Bulletin*, November 2004.
140. **Robertson, D. L., P. M. Sharp, F. E. McCutchan, and B. H. Hahn.** 1995. Recombination in HIV-1. *Nature* **374**:124-6.
141. **Rodenburg, C. M., Y. Li, S. A. Trask, Y. Chen, J. Decker, D. L. Robertson, M. L. Kalish, G. M. Shaw, S. Allen, B. H. Hahn, and F. Gao.** 2001. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:161-8.
142. **Rowland-Jones, S., J. Sutton, K. Ariyoshi, T. Dong, F. Gotch, S. McAdam, D. Whitby, S. Sabally, A. Gallimore, T. Corrah, and et al.** 1995. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* **1**:59-64.
143. **Salemi, M., K. Strimmer, W. W. Hall, M. Duffy, E. Delaporte, S. Mboup, M. Peeters, and A. M. Vandamme.** 2001. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *Faseb J* **15**:276-8.

144. **Salminen, M. O., J. K. Carr, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**:1423-5.
145. **Salminen, M. O., J. K. Carr, D. L. Robertson, P. Hegerich, D. Gotte, C. Koch, E. Sanders-Buell, F. Gao, P. M. Sharp, B. H. Hahn, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1997. Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* **71**:2647-55.
146. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
147. **Serwadda, D., R. D. Mugerwa, N. K. Sewankambo, A. Lwegaba, J. W. Carswell, G. B. Kirya, A. C. Bayley, R. G. Downing, R. S. Tedder, S. A. Clayden, and et al.** 1985. Slim disease: a new disease in Uganda and its association with HTLV-III infection. *Lancet* **2**:849-52.
148. **Sharp, P. M., E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago, and B. H. Hahn.** 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:867-76.
149. **Sharp, P. M., E. Bailes, D. L. Robertson, F. Gao, and B. H. Hahn.** 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull* **196**:338-42.
150. **Sheppard, H. W., W. Lang, M. S. Ascher, E. Vittinghoff, and W. Winkelstein.** 1993. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *Aids* **7**:1159-66.
151. **Simon, F., P. Mauciere, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M. C. Muller-Trutwin, S. Saragosti, M. C. Georges-Courbot, F. Barre-Sinoussi, and F. Brun-Vezinet.** 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**:1032-7.
152. **Smith, S. W., R. Overbeek, C. R. Woese, W. Gilbert, and P. M. Gillevet.** 1994. The genetic data environment an expandable GUI for multiple sequence analysis. *Comput Appl Biosci* **10**:671-5.

153. **Su, L., M. Graf, Y. Zhang, H. von Briesen, H. Xing, J. Kostler, H. Melzl, H. Wolf, Y. Shao, and R. Wagner.** 2000. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol* **74**:11367-76.
154. **Taylor, J. E., and B. T. Korber.** 2005. HIV-1 intra-subtype superinfection rates: estimates using a structured coalescent with recombination. *Infect Genet Evol* **5**:85-95.
155. **Thomson, M. M., E. Delgado, N. Manjon, A. Ocampo, M. L. Villahermosa, A. Marino, I. Herrero, M. T. Cuevas, E. Vazquez-de Parga, L. Perez-Alvarez, L. Medrano, J. A. Taboada, and R. Najera.** 2001. HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *Aids* **15**:509-16.
156. **Tovanabutra, S., V. Watanaveeradej, K. Viputtikul, M. De Souza, M. H. Razak, V. Suriyanon, J. Jittiwutikarn, S. Sriplienchan, S. Nitayaphan, M. W. Benenson, N. Sirisopana, P. O. Renzullo, A. E. Brown, M. L. Robb, C. Beyrer, D. D. Celentano, J. G. McNeil, D. L. Birx, J. K. Carr, and F. E. McCutchan.** 2003. A new circulating recombinant form, CRF15_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:561-7.
157. **UNAIDS.** 2001. AIDS epidemic update, December 2001.
158. **UNAIDS.** 2002. AIDS epidemic update, December 2002. UNAIDS, WHO.
159. **UNAIDS.** 2003. AIDS epidemic update, December 2003.
160. **UNAIDS.** 2004. AIDS epidemic update, December 2004.
161. **Vartanian, J. P., A. Meyerhans, M. Sala, and S. Wain-Hobson.** 1994. G-->A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3092-6.
162. **Verdrager, J.** 1995. [AIDS. Hypothesis on the origin and emergence of HIV]. *Bull Soc Pathol Exot* **88**:54-9; discussion 59-60.
163. **Vesanen, M., M. Salminen, M. Wessman, H. Lankinen, P. Sistonen, and A. Vaheri.** 1994. Morphological differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma

- cells inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Gen Virol* **75** (Pt 1):201-6.
164. **Wabl, M., P. D. Burrows, A. von Gabain, and C. Steinberg.** 1985. Hypermutation at the immunoglobulin heavy chain locus in a pre-B-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:479-82.
165. **Wain-Hobson, S.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**:181-93.
166. **Wang, B., R. B. Lal, D. E. Dwyer, M. Miranda-Saksena, R. Boadle, A. L. Cunningham, and N. K. Saksena.** 2000. Molecular and biological interactions between two HIV-1 strains from a coinfecting patient reveal the first evidence in favor of viral synergism. *Virology* **274**:105-19.
167. **Wei, Q., and P. N. Fultz.** 1998. Extensive diversification of human immunodeficiency virus type 1 subtype B strains during dual infection of a chimpanzee that progressed to AIDS. *J Virol* **72**:3005-17.
168. **Weiner, S. A. C. D. B.** 2003. Present Status of Human HIV Vaccine Development, Medscape.
169. **Wilbe, K., C. Casper, J. Albert, and T. Leitner.** 2002. Identification of two CRF11-cpx genomes and two preliminary representatives of a new circulating recombinant form (CRF13-cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:849-56.
170. **Wooley, D. P., R. A. Smith, S. Czajak, and R. C. Desrosiers.** 1997. Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. *J Virol* **71**:9650-3.
171. **Xin, K. Q., X. H. Ma, K. A. Crandall, H. Bukawa, Y. Ishigatsubo, S. Kawamoto, and K. Okuda.** 1995. Dual infection with HIV-1 Thai subtype B and E. *Lancet* **346**:1372-3.
172. **Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.

-
173. **Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp, and D. D. Ho.** 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**:594-7.
174. **Zhu, T., N. Wang, A. Carr, S. Wolinsky, and D. D. Ho.** 1995. Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter. *J Virol* **69**:1324-7.
175. **Ziegler, J. S., Y. Su, K. P. Corcoran, L. Nie, P. E. Mayrand, L. B. Hoff, L. J. McBride, M. N. Kronick, and S. R. Diehl.** 1992. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* **14**:1026-31.

8 Danksagung

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Löscher und Herrn Prof. Dr. Frank von Sonnenburg für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Infektions- und Tropenmedizin durchzuführen und für die mir dabei gewährleistete Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. Michael Hölscher, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir einen Auslandsaufenthalt in den USA und mehrere Teilnahmen an Kongressen und Workshops ermöglichte.

Die Sequenzierungen habe ich in Rockville, USA im Labor von Frau Dr. Francine McCutchan durchgeführt. Sie und ihre Arbeitsgruppe, vor allem Sodsai Tovanabutra und Eric Sanders-Buell, haben wesentlich zum Gelingen des Projektes beigetragen. Sie waren immer für mich da, wenn ich eine Frage hatte, haben mich motiviert und auch privat unterstützt. Nicht zuletzt die nette Arbeitsatmosphäre hat sehr zu einem gelungenen Aufenthalt beigetragen.

Ganz lieb möchte ich mich auch bei unserer Sekretärin, Frau Marion Göldner, für ihre Unterstützung bei Bestellungen, Sendungen und Verwaltungsarbeiten bedanken. Ohne ihren Durchblick hätten so manche Dinge viel, viel länger gedauert. Außerdem hat sie es immer mit tröstenden Worten geschafft, mich wieder aufzubauen, wenn es mal nicht so gut lief.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir während Studium und Promotion immer mit viel Interesse und Verständnis zur Seite standen, die mich immer wieder motiviert und auch mal getreten haben, wenn es nur sehr langsam voran ging und auf die ich mich immer verlassen konnte.

Nicht zuletzt einen lieben Dank an meinen Freund Thomas, der tapfer alle meine Stimmungsschwankungen ertrug, mich immer wieder liebevoll aufbaute, nicht murrte, wenn es mal später wurde und mir das Gefühl gab, nicht allein zu sein.

9 Lebenslauf

Name Martina Gerhardt
 Geboren am 19. November 1974 in Berlin
 Staatsangehörigkeit deutsch
 Familienstand ledig
 Adresse Nordendstr. 7A, 80799 München
 Tel: (089) 201 53 52
martina_gerhardt@yahoo.de

Ausbildung

1981-1989 Polytechnische Oberschule in Berlin
 1989-1994 Naturwissenschaftliches Gymnasium „Heinrich Hertz“ in Berlin
 Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife, Abitur
 1994-1995 Au pair und Sprachunterricht in London
 1995-1996 Zwei Semester Pharmaziestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin
 1996-2000 Fortsetzung des Pharmaziestudiums an der LMU München
 September, Oktober 2000 Praktikum in einem Kinderkrankenhaus in San Salvador, El Salvador
 2000-2001 Praktika in der Industrie und der öffentlichen Apotheke
 Mai 2002 Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit

1997-1998 studentische Hilfskraft im Genzentrum München
 Mai-August 2000 wissenschaftliche Hilfskraft im GSF in Großhadern
 2002-2005 Vertretungen in diversen Apotheken in München
 Mai 2002- Mai 2005 Promotion am Institut für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München einschließlich eines sechsmonatigen Arbeitsaufenthaltes in Rockville, USA
 seit Juni 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München (PCR-Diagnostik für Tuberkulose, Doktorandenbetreuung)
 ab August 2005 Laborleiter und Studienkoordinator innerhalb des MMRP in Mbeya, Tansania

