

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

Lehrstuhl: Virologie

Vorstand: Prof. Dr. med. U. Koszinowski

Optimierung und quantitative Auswertung eines hochsensitiven Reverse Transkriptase- Aktivitäts Assays

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

vorgelegt von

Martin Obermeier

aus

Landshut

Jahr

2006

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Eberle

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. D. Rapaport
Prof. Dr. med. Chr. P. Sommerhoff
Priv. Doz. Dr. med. J. Liese**

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2006

Abkürzungsverzeichnis

3TC	3-Thia-Cytidin
3TC-TP	3-Thia-Cytidin-Triphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AZT	Azidothymidin
AZT-TP	Azidothymidin-Triphosphat
bp	Basenpaare
CT	Cycle Threshold
D4T	Didehydrodeoxythymidin
DDC	Dideoxycytidin
DDI	Dideoxyinosin
DNA	Deoxyribonucleicacid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxy-Nucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HXB2	HIV-1 Subtyp B Referenz-Klon
mAb	monoclonal Antibodies
mRNA	Messenger RNA
MS2	Bacteriophage MS2
MvP 899	HIV-1/B-Isolat, als Dauerkultur am Max von Pettenkofer Institut
NAT	Nucleic Acid Testing
NNRTI	Nicht-Nukleosidischer RT Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer/Nukleotidischer RT Inhibitor
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PERT	Product Enhanced RT-Assay
POD	Peroxidase
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonucleicacid
RNAse	Ribonuclease
ROC	Receiver Operating Characteristics
RT	Reverse Transkriptase
Taq	Thermophilus aquaticus
UNG	Uracil-N-Glycosylase
VL	Viruslast

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus (HIV).....	7
1.1.1	Struktureller Aufbau (Abbildung 1 und 2).....	7
1.1.2	Genomischer Aufbau.....	8
1.2	HIV-Replikationszyklus.....	9
1.2.1	Überblick.....	9
1.2.2	Aufbau, Aufgaben und Funktion der Reversen Transkriptase (RT).....	10
1.3	HIV-Therapie.....	13
1.3.1	Ansatzpunkte der HIV-Therapie.....	13
1.3.2	RT als Zielstruktur von Inhibitoren.....	13
1.3.2.1	Nukleosidische RT Inhibitoren (NRTI).....	13
1.3.2.2	Nicht-Nukleosidische RT Inhibitoren (NNRTI).....	14
1.3.3	Resistenzentwicklung der RT.....	15
1.4	Virologische HIV-Diagnostik.....	15
1.4.1	Nachweis einer HIV–Infektion.....	15
1.4.1.1	Antikörper-Nachweismethoden.....	15
1.4.1.2	Virusnachweis-Methoden.....	16
1.4.2	Therapeutisches Monitoring.....	16
1.4.2.1	Parameter des Immunsystems.....	16
1.4.2.2	Viruslast.....	17
1.4.2.3	Therapieversagen/Resistenz.....	17
1.4.2.3.1	Genotypische Resistenztestung.....	17
1.4.2.3.2	Phänotypische Resistenztests.....	18
1.5	RT-Aktivitäts Assays.....	18

1.5.1	Methoden.....	18
1.5.1.1	Verfahren mit Nachweis durch markierte Nukleotide.....	19
1.5.1.2	Verfahren mit Nachweis durch PCR-Amplifikation.....	19
1.5.2	Verwendung.....	19
1.6	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Prinzipieller Ablauf des Tests.....	21
2.2	Zellen und Zellkultur.....	21
2.2.1	Spender-PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells).....	21
2.2.2	H9-Zellen.....	22
2.3	Quellen für RT.....	22
2.3.1	Zellkulturüberstände.....	22
2.3.1.1	Dauerkulturen.....	22
2.3.1.2	Anzucht von Subtypen und resistenter Stämme.....	23
2.3.2	Rekombinante HIV-RT.....	25
2.3.3	Patientenplasma.....	25
2.4	Reverse Transkription.....	25
2.4.1	Auswahl von Template und Primern, Reaktionsbedingungen.....	25
2.4.2	Inhibition mit AZT und 3TC.....	29
2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
2.5.1	Ablauf der PCR.....	29
2.5.2	Auswahl der Primer.....	33
2.5.3	HotStart Methode.....	35
2.5.4	Dekontaminations-Strategie mit Uracil-N-Glycosylase (UNG).....	36
2.6	Nachweis von PCR-Produkten.....	37

2.7	Quantifizierung von PCR-Produkten.....	37
2.7.1	Endpunktsbestimmungen.....	37
2.7.2	Real-Time-Quantifizierung.....	38
2.7.2.1	SYBR Dye Green I.....	39
2.7.2.2	FRET-Hybridisierungssonden.....	40
2.7.2.3	Molecular Beacons.....	41
2.8	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	43
2.9	Berechnung von Sensitivität und Spezifität.....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Optimierung der RT-Reaktion.....	44
3.1.1	MgCl ₂ Konzentration.....	44
3.1.2	Optimierung der RT-Primer-Sequenz.....	45
3.2	Dekontaminationsstrategie mit UNG.....	47
3.3	Effektivität der Entfernung überschüssiger Template-RNA.....	48
3.4	Optimierung der PCR-Reaktion.....	49
3.4.1	Optimierung des Probeneinsatzes in die PCR-Reaktion und der Magnesiumkonzentration in der PCR-Reaktion.....	49
3.5	Sensitivitätsgrenzen.....	51
3.5.1	Synthetische RT.....	51
3.5.2	Nachweis von RT-Aktivität in Plasma.....	52
3.5.2.1	Grenzen der Plasma-Einsatzmenge.....	52
3.5.2.2	Nachweisgrenze in Plasma.....	52
3.5.2.3	Nachweis von RT-Aktivität in Patientenproben.....	53
3.6	Spezifität und Störfaktoren.....	54
3.6.1	Spezifität und Sensitivität bei Verwendung von Zellkulturüberständen HIV-infizierter Zellen.....	54

3.6.2	Spezifität und Sensitivität bei Verwendung rekombinanter RT.....	54
3.6.3	Störfaktoren.....	55
3.7	Beispiel für den Nachweis von Resistenz gegen AZT und 3TC.....	56
3.8	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	58
4	Diskussion.....	59
4.1	Optimierung des Verfahrens.....	59
4.1.1	Bindung des RT-Primers.....	59
4.1.2	Intrinsische RT-Aktivität der Taq-Polymerase.....	60
4.2	Spezifität.....	61
4.2.1	Auswertung der Spezifität.....	61
4.2.2	Beeinflussung durch zelluläre Polymerasen.....	61
4.3	Nachweisgrenze.....	61
4.4	Nachweisgrenze im Blutplasma.....	62
4.4.1	Schlechtere Nachweisgrenze im Blutplasma.....	62
4.4.2	Mögliche Gründe für schlechteren Nachweis.....	63
4.4.3	Mögliche Methoden zur Verbesserung.....	63
4.4.3.1	Anreicherung durch Zentrifugation.....	63
4.4.3.2	Anreicherung über Affinitätsbindung.....	64
4.5	Mögliche Anwendungsgebiete.....	64
4.5.1	Kontaminationsüberwachung im Produktionsprozess von Therapeutika.....	64
4.5.2	RT-Aktivitätsnachweis bei inkonsistenten HIV-Viruslasten.....	65
4.5.3	RT-Aktivitätsnachweis bei bisher unbekanntem Retroviren.....	65
4.5.4	RT-Last und Viruslast als Parameter für virale Fitness.....	66
4.5.5	Schneller phänotypischer Nachweis für Resistenzen gegen die RT... ..	66
5	Zusammenfassung.....	68

6	Protokoll für den Nachweis von RT-Aktivität in Zellkulturüberständen	70
7	Abbildungsverzeichnis.....	73
8	Tabellenverzeichnis.....	75
9	Literaturverzeichnis.....	77
10	Danksagung.....	82
11	Lebenslauf.....	83

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)

1.1.1 Struktureller Aufbau (Abbildung 1 und 2)

Das HIV ist ein behülltes Virus, dessen Hüllmembran aus der Cytoplasmamembran der Wirtszelle stammt. In dieser Cytoplasmamembran verankert sich das Transmembranprotein gp41 (glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 41 kDalton), welches nicht-kovalent mit dem außen anliegenden gp120 verbunden ist. In der Hüllmembran befinden sich zusätzlich noch Proteine die beim Budding, also dem Ausknospen und Loslösen des neuen Viruspartikels von der Wirtszelle, aus der Cytoplasmamembran mitgenommen werden (z.B. MHC II; Cantin 1996). Weiter zum Kern des Partikels gerichtet findet sich eine netzähnliche Schicht aus dem Matrixprotein p17, welches über eine N-terminale Myristilierung mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden ist. Im Partikelzentrum findet man das Viruscapsid oder Core, welches im Fall von HIV eine konische Form aufweist und aus p24 besteht. Im Inneren des Core findet man zwei Moleküle (+)-Einzelstrang-RNA, die mit Nucleocapsidprotein p7 komplexiert sind und an die jeweils ein Molekül Reverse Transkriptase (RT) gebunden ist. Des weiteren findet man im Core auch weitere Moleküle Protease, Integrase und RT (Modrow 1997).

Abbildung 1: Aufbau des HIV (nach Modrow 1997)

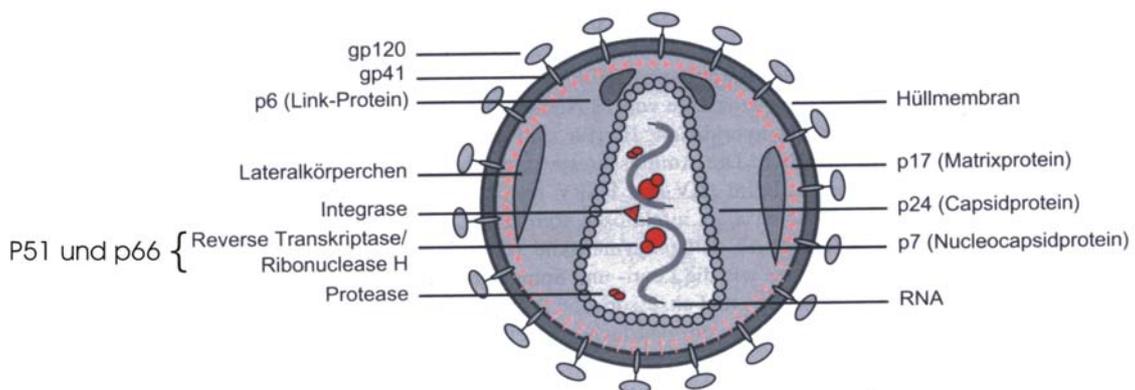
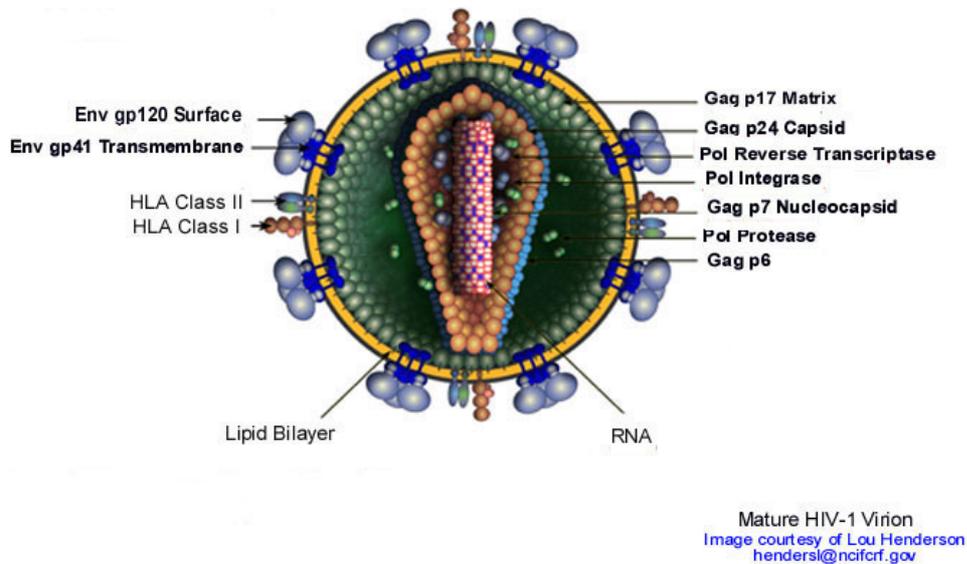


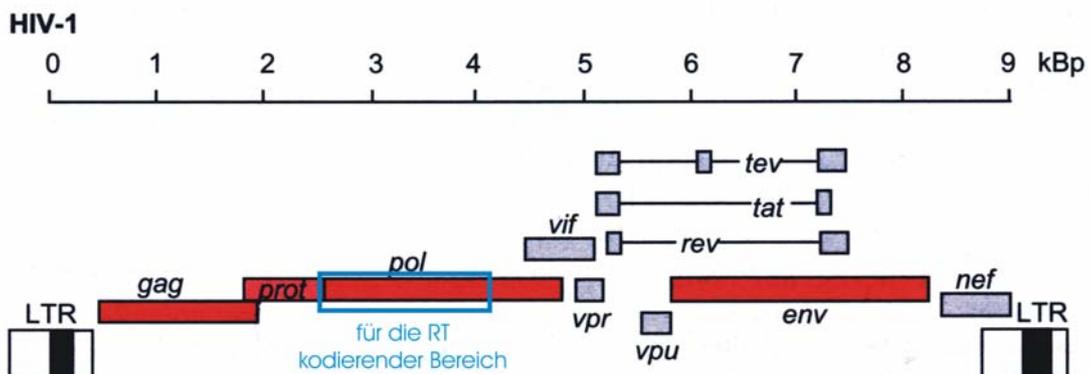
Abbildung 2: Räumliche Ansicht des Aufbaus von HIV (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/STRUCTURE/INDEX.HTML>)



1.1.2 Genomischer Aufbau

Das HIV-Genom besteht aus einer Einzelstrang-RNA mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Polyadenylierung und hat damit den Aufbau einer eukaryotischen Messenger-RNA (mRNA). In den flankierenden LTR-Regionen (Long Terminal Repeats) befinden sich verschiedene Sequenzen, die entweder für die Umschreibung (tRNA_{LYS}-Primer-Bindungsstelle, Polypurintrakt) oder für die retrovirale Genexpression nötig sind (Promoter und Enhancerelemente). Das Genom kodiert für verschiedene kleinere Regulator-, Struktur- und akzessorische Proteine (tev, tat, rev, vpr, vif, vpu und nef) und die drei großen Vorläuferproteine gag, gag/pol und env aus denen später die Struktur-, Enzym- und Hüllproteine entstehen.

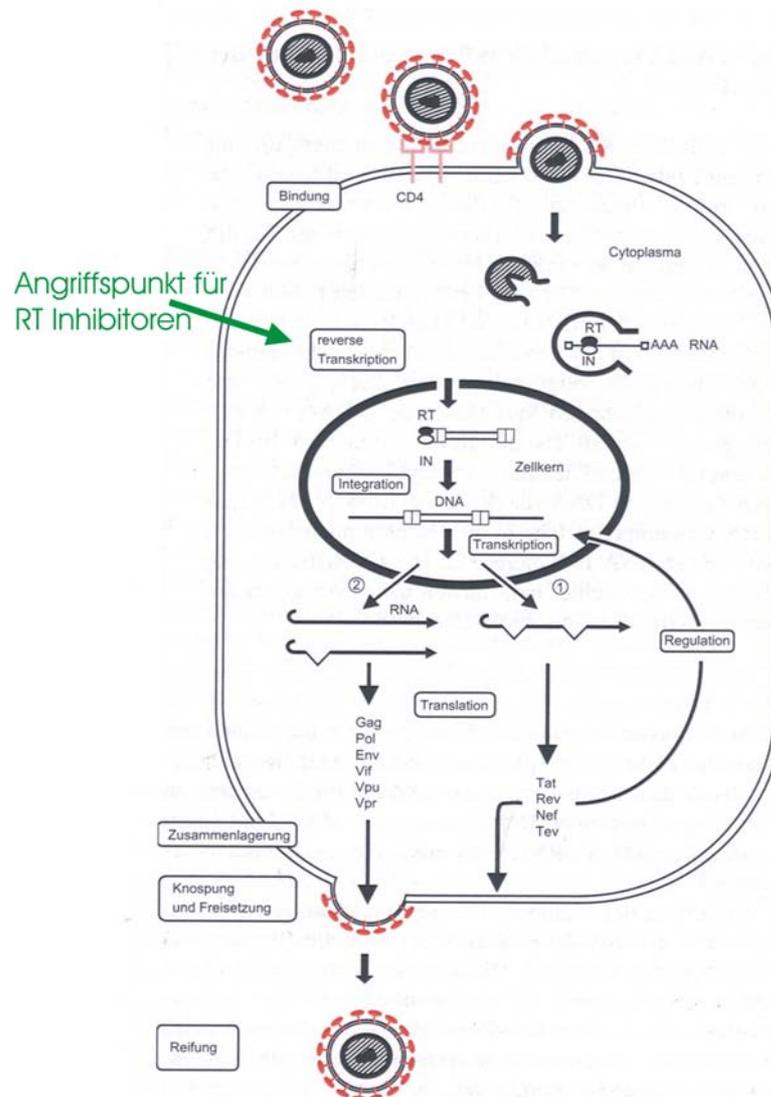
Abbildung 3: HIV-Genomaufbau (nach Modrow 1997)



1.2 HIV-Replikationszyklus

1.2.1 Überblick

Abbildung 4: Replikationszyklus des HI-Virus (nach Modrow 1997)



Über die C3-Region des gp120 bindet ein freies HI-Virus an den CD4-Rezeptor, beispielsweise einer T-Helferzelle. Das HI-Virus verschmilzt mit der Zelloberfläche, ein Vorgang der durch Chemokin- bzw. Cytokinrezeptoren unterstützt wird und über Umfaltung im gp120 zustande kommt. Während des Eindringens bleibt das Core intakt und ändert seine Konformation um die Aufnahme von Nukleotiden zu ermöglichen; diese dienen als „Treibstoff“, des nächsten Schrittes, der reversen Transkription. Die RT erzeugt aus der vorhandenen RNA doppelsträngige DNA. Die Integrase deponiert nun dieses virale DNA-Genom an einer beliebigen Stelle im humanem Genom. Diese integrierte provirale DNA

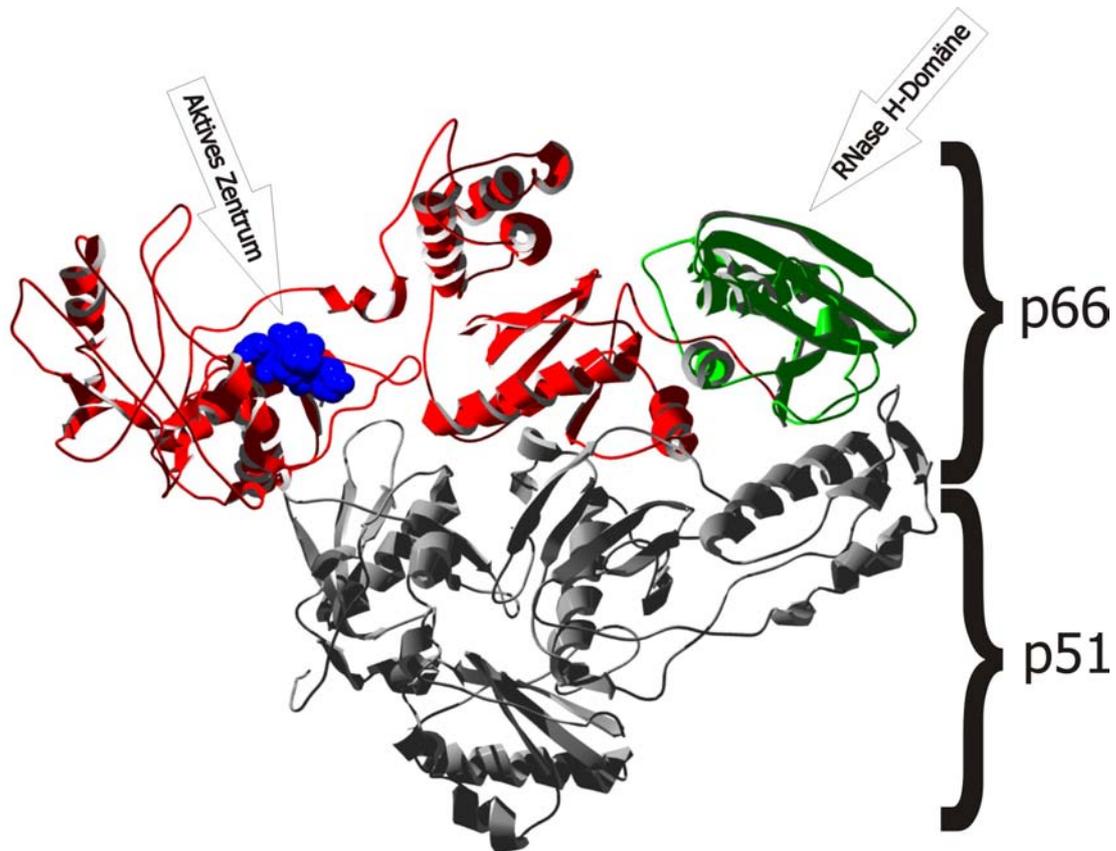
wird als Template für die Produktion neuer viraler Genome und der verschiedenen viralen mRNAs verwendet. Diese liegen schon in aktiver Form nach der Translation aus den zum Teil mehrfach gespleißten mRNAs vor. Das gag-Vorläuferprotein wird durch die virale Protease in das Matrixprotein p17, das Capsidprotein p24, das Nucleocapsidprotein p7 und das Linkprotein p6 prozessiert. Das gag/pol-Vorläuferprotein wird auf gleiche Weise in Protease, RT und Integrase überführt. Die Protease verfügt dabei über die Möglichkeit sich selbst aus dem Vorläuferprotein zu prozessieren. Aus dem Envelope-Protein (env, gp160) werden das gp41 und das gp120 prozessiert. Aus den Strukturbestandteilen wird nun ein neues Virus zusammengesetzt, das nach Knospung aus der zytoplasmatischen Oberfläche und vollständiger Reifung wieder zu einem infektiösen Partikel führt.

1.2.2 Aufbau, Aufgaben und Funktion der Reversen Transkriptase (RT)

Die RT ist ein heterodimeres Molekül bestehend aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten p51 und p66. Das p51 ist N-terminal identisch mit p66, welches zusätzlich die 15 kD schwere RNase-H Domäne aufweist.

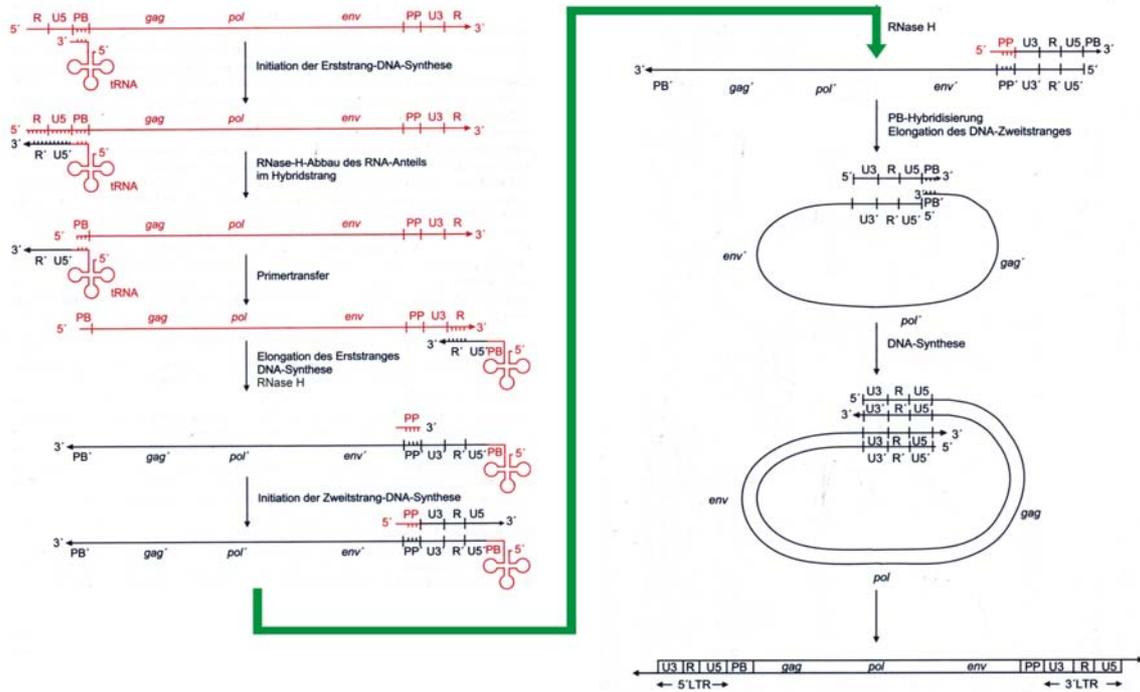
Abbildung 5: Räumliche Struktur des HIV

(Rendering mit Povray <http://www.povray.org>) der Struktur 1HQU (Hsiou 2001) aus der 3D-Strukturdatenbank RCSB (<http://www.rcsb.org>), zusätzliche Bearbeitung mit DeepView (Guex 1997)



Die RT katalysiert zuerst die reverse Transkription des vorliegenden RNA-Einzelstranges in einen DNA-Einzelstrang (RNA-abhängige DNA-Polymerasetätigkeit). Nach RNase-Verdau des RNA-Anteils des Hybridstrangs generiert die RT anschließend den Komplementärstrang um einen DNA-Doppelstrang zu erhalten (DNA-abhängige DNA-Polymerasetätigkeit.), s. Abbildung 6.

Abbildung 6: Ablauf der Erst- und Zweitstrangsynthese im Rahmen des Replikationszyklus (nach Modrow 1997)



Nach Anlagern des $tRNA_{LYS}$ -Primers im LTR beginnt die RT mit ihrer Tätigkeit. An den Primer werden Nukleotide angeknüpft, während die bereits umgeschriebene RNA durch die RNase-H-Funktion des Enzyms verdaut wird. Nach Umlagerung des Primers wird nun ein kompletter DNA-Einzelstrang erzeugt, an dem nur noch ein kleines Stück RNA im so genannten Polypurintrakt hängt, welcher als Primer für die nun folgende Zweitstrangsynthese dient.

1.3 HIV-Therapie

Die Anti-Retrovirale Therapie ist ein wichtiger Bestandteil der HIV-Therapie, da sie durch Erschweren der Virusreplikation und Reduktion der Virusmenge zu einer Entlastung des Immunsystems führt und somit ein bedrohliches Absinken der T-Helferzell-Zahl verhindern kann (Katzenstein 1996). Natürlich bleibt die Anti-Retrovirale Therapie aber immer nur ein Baustein in einem therapeutischen Gesamtkonzept mit dem Ziel der Immunrestitution. Weitere wichtige Komponenten sind Betreuung, Therapie opportunistischer Infektionen und Maßnahmen bei Unverträglichkeit von Medikamenten.

1.3.1 Ansatzpunkte der HIV-Therapie

Als Ansatzpunkte einer Anti-Retroviralen Therapie (ART) bieten sich Funktionen des Virus an, die für das Virus notwendig sind und nicht durch zelluläre Funktionen übernommen werden. Im Fall von HIV scheinen geeignete Ansatzpunkte die Bindung und Fusion mit der Oberfläche durch Bindungs- und Fusionsinhibitoren zu sein, die Inhibition der RT, der Integrase und der Protease. Bis jetzt finden sich im klinischen Einsatz Inhibitoren der RT, der Protease und bislang ein Fusionsinhibitor. Weitere Medikamente der oben genannten Gruppen befinden sich in verschiedenen Phasen der Entwicklung.

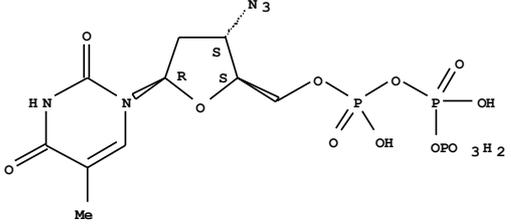
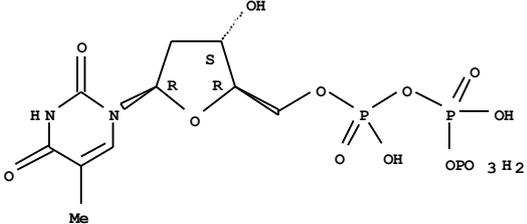
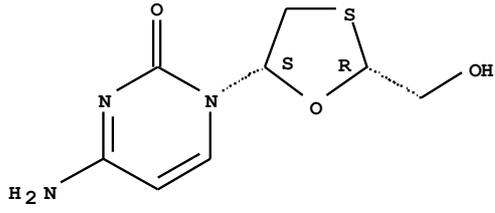
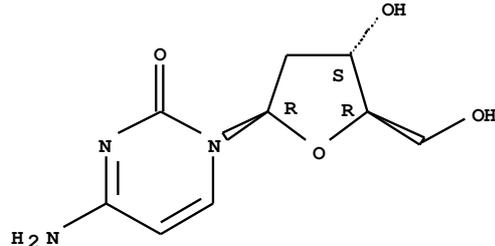
1.3.2 RT als Zielstruktur von Inhibitoren

1.3.2.1 Nukleosidische RT Inhibitoren (NRTI)

Bei der RT unterscheidet man zwei Arten von Inhibitoren. Die nukleosidischen RT Inhibitoren (NRTI) sind alle von im menschlichen Körper vorkommenden Deoxy-Nukleotiden hergeleitet. Bei allen NRTI gehen der Wirkung an der Polymerase zumindest Phosphorylierungsschritte voraus. Bei Abacavir oder DDI kommen noch weitere Metabolisierungsschritte hinzu (Faletto 1997; s. Tabelle 1).

Tabelle 1: NRTI und ihre zugrunde liegenden Nucleoside.

Im Fall von AZT werden hier die aktiven Metaboliten der Polymerasereaktion dargestellt.

Nucleosidischer RT Inhibitor	Zugrunde liegendes Nucleotid/Nucleosid
<p>AZT-TP</p> 	<p>dTTP (2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat)</p> 
<p>3TC (3'-Thia-2',3'-dideoxycytidin)</p> 	<p>2'-Deoxycytidin</p> 

Die prinzipielle Funktionsweise der bei HIV verwendeten NRTIs ist ein Kettenabbruch. An während der Elongation benutzten Inhibitoren bricht aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe die Polymerisation ab (Balzarini 1994).

1.3.2.2 Nicht-Nucleosidische RT Inhibitoren (NNRTI)

Die Nicht-Nucleosidischen RT Inhibitoren (NNRTI) sind strukturell unterschiedlich zu den NRTIs. Die NNRTIs binden in der Nähe des aktiven Zentrums (genauer: in der non-nucleoside inhibitor binding pocket site neben dem aktiven Zentrum) der RT und blockieren somit deren Aktivität. Sie sind spezifischer bei der Wahl der Zielstruktur und zeigen ihre beste Wirksamkeit bei HIV-1 Subtyp B (Ren 2000).

1.3.3 Resistenzentwicklung der RT

Aufgrund der Ungenauigkeit der RT werden während der Replikation immer wieder spontan Mutationen in das HIV-Genom eingefügt. Der Anteil zellulärer Polymerasen an der Resistenzentwicklung wird noch diskutiert (Modrow 1997). Einige dieser Mutationen führen zu nicht-replikationskompetenten oder in der Replikation behinderten Viren, andere führen zu keinen Unterschieden im Phänotyp, also keiner Änderung in der Funktion. Manche Mutationen aber führen zur Entwicklung einer Unempfindlichkeit gegen Virostatika. Mutationen, die zur Resistenz gegen NNRTIs führen, sind meist nah am aktiven Zentrum zu finden; Mutationen gegen die NRTIs dagegen in der Fingerdomäne (Resistance mutation database <http://www.mediscover.net/mutationintro.cfm>).

1.4 Virologische HIV-Diagnostik

Die virologische Diagnostik ist ein Teil der diagnostischen Laborverfahren die zum Nachweis einer HIV-Infektion und zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Klinische Hinweise auf eine HIV-Infektion, wie eine Serokonversionskrankheit, eine EBV-Reaktivierung und vor allem das Auftreten einer opportunistischen Infektion, sollten sowohl immunologisch als auch virologisch untersucht werden. Die Dokumentation des Therapieverlaufs mit Viruslast und Bestimmung der Anzahl der CD4+-Lymphozyten kann frühzeitig vor Verschlechterung des Krankheitsverlaufs warnen (NIH Antiretroviral Treatment Guidelines <http://aidsinfo.nih.gov/>).

1.4.1 Nachweis einer HIV-Infektion

Die virologischen Methoden zum Nachweis einer HIV-Infektion lassen sich, wie bei vielen anderen Viren, in den Nachweis der Antikörper, also indirekten Nachweisverfahren oder den direkten Nachweis des Virus bzw. seiner Bestandteile (Proteine, Genom) unterscheiden.

1.4.1.1 Antikörper-Nachweismethoden

Bereits wenige Woche nach Infektion kommt es zu einer meist sehr starken Virämie, die von einer beginnenden Antikörperproduktion (Serokonversion) gefolgt wird. In dieser Phase sinkt die Plasma-Viruskonzentration dann auf eine individuell unterschiedliche Höhe.

Die Fähigkeit zur HIV-Antikörperproduktion bleibt, da ständiger Antigen-Reiz vorhanden

ist, sehr lange erhalten. Dies könnte sich erst ändern, falls einmal eine Heilung möglich wäre.

Der Nachweis von HIV-Antikörpern mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) oder MEIA (Mikropartikel Enzym Immuno Assay) Technik ist ein preiswertes Verfahren mit hoher Sensitivität und ausreichender Spezifität, das als Suchtest gut geeignet ist.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wird in allen Fällen bei erstmalig reaktivem Antikörpersuchtest ein Bestätigungstest (z.B. Immunoblot oder Line Immuno Assay, LIA) durchgeführt (Doerr 1998).

1.4.1.2 Virusnachweis-Methoden

Bei den Virusnachweis-Methoden gibt es zwei verschiedene Ansätze:

Erstens besteht die Möglichkeit des direkten Nachweises von viralen Proteinen, hier hauptsächlich des p24-Antigens, welches auch über ELISA nachgewiesen werden kann. Hierzu muss aber eine ausreichend hohe Plasmavirämie und eine möglichst niedrige Menge an Anti-p24 Antikörpern vorliegen, was dazu führt, dass p24-Antigen nicht während des gesamten Krankheitsverlaufs nachgewiesen werden kann. In Kombitests mit Antikörpernachweis wird aber die weiter oben beschriebene Eigenschaft des hohen Virusanstiegs vor der Serokonversion ausgenutzt, um das diagnostische Fenster der reinen Antikörper-Nachweistests zwischen Infektion und Antikörper-Bildung zu verkürzen.

Eine zweite Methode des direkten Virusnachweises ist der Nachweis der viralen RNA, bzw. proviralen DNA mittels PCR-Technik, die später noch genauer beschrieben wird (Doerr 1998).

1.4.2 Therapeutisches Monitoring

Nicht nur die rasante Entwicklung im Bereich der anti-retroviralen Substanzen hat zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie geführt. Eine wichtige Rolle spielten hier auch die diagnostischen Methoden zum rechtzeitigen Hinweis auf ein Therapieversagen und Nachweise der Gründe dafür.

1.4.2.1 Parameter des Immunsystems

Die Bestimmung der Anzahl der CD4+-Lymphozyten im peripheren Blut liefert sowohl Hinweise auf den Schaden, der durch das HIV schon entstanden ist, als auch auf die Gefährdung durch opportunistische Infektionen. Dieser wichtigste immunologische Parameter in

der HIV-Diagnostik sei hier nur der Vollständigkeit halber genannt, auf Nennung weiterer immunologischer Parameter wird im thematischen Rahmen dieser Doktorarbeit bewusst verzichtet.

1.4.2.2 Viruslast

Nachdem schon früh erkannt wurde, dass die Menge des im peripheren Blut vorhandenem Virus (Viruslast, VL) in Zusammenhang mit der Anzahl der CD4+-Lymphozyten eine Prognose für den zeitlichen Ablauf der Erkrankung erlaubt, also die vermutliche Dauer bis zum Eintritt einer AIDS-Symptomatik nach Infektion abschätzbar wird, kam der VL-Bestimmung eine Hauptrolle in der Verlaufsdiagnostik zu. Eine Möglichkeit der Viruslastbestimmung, eine quantifizierte RT-PCR, besteht aus der Extraktion der viralen RNA-Genome aus dem Patientenplasma, deren Umschreibung in DNA mittels RT und einer quantitativen PCR; diese Methodik wird im Methodenteil noch beschrieben.

1.4.2.3 Therapieversagen/Resistenz

Ein Therapieversagen kann mehrere Gründe haben. Anamnestisch können Gründe wie Resorptionsprobleme bei Diarrhöen, Einnahme der Medikamente mit wirkstoffbindenden oder resorptionsverhindernden Nahrungsmitteln oder Einnahme von Medikamenten, die Einfluss auf Resorption oder Abbau haben, geklärt werden. Eine Laboruntersuchung, die zur Abklärung helfen kann, sind Plasmaspiegelbestimmungen. Bestimmungen der Intrazellulärspiegel der Wirkstoffe sind erst in den Anfängen und sollen Hinweise auf zelluläre Aufnahmestörung, geänderte Verstoffwechslung und geänderte Aktivierung durch z.B. Phosphorylierung aufzeigen.

Die am besten etablierten Labormethoden zur Klärung eines Therapieversagens sind die Bestimmungen der Resistenzlage des HIV gegen die verschiedenen antiviralen Medikamente. Hier kann man vor allem zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze unterscheiden.

1.4.2.3.1 Genotypische Resistenztestung

Die Resistenz des HI-Virus gegen ein bestimmtes Medikament kommt durch eine Veränderung der Zielstruktur zustande. Dies wird durch Veränderungen der Aminosäurekette des Zielproteins erreicht, was zu Ladungs- und Strukturveränderungen führt, die eine vorher vorhandene Wirksamkeit erheblich reduzieren können. Änderungen der Aminosäuresequenz sind direkte Abbildungen von Änderungen in der Gen-Sequenz, die ein Zielprotein kodiert. Aus Zellkulturversuchen, die bestimmte resistente Stämme selektionieren oder aus klinischen Studien mit Patienten, die offensichtlich mit einem resistenten Virus infiziert

sind, kann man bestimmte Mutationen identifizieren, die zu Resistenz führen.

Genotypische Verfahren basieren somit prinzipiell auf einer Sequenzierung der betroffenen HIV-Gene und anschließendem Vergleich mit einer Datenbank resistenzassoziierter Mutationen.

Möglichkeiten der Sequenzierung sind zur Zeit noch am häufigsten Thermocycler-basierte Dyedideoxiterminator-Verfahren, aber auch sequenzspezifische Hybridisierung (z.B. Inno-Lipa und Affymetrix „Genchips“).

1.4.2.3.2 Phänotypische Resistenztests

Bei den phänotypischen Resistenztests wird eine Annäherung an das tatsächliche Geschehen im Körper des Patienten versucht. Lymphozytäre Zellen werden unter Zellkulturbedingungen mit dem vermeintlich resistenten Virus eines Patienten infiziert und bei produktiver Infektion mit verschiedenen Wirksubstanzen inkubiert. Die nachfolgende Messung der Virusmenge im Zellkulturüberstand ermöglicht eine Aussage über die inhibitorische Potenz der Medikamente gegen diesen Virusstamm.

Verschiedene derartige Verfahren sind hier entwickelt worden (im Handel verfügbare Tests, u.a. von den Firmen Virco und Virologic, neben selbständigen Entwicklungen an Universitäten), um die Infektion der Zellkulturen zu erleichtern und die Dauer des Tests zu verkürzen.

Die Dauer ist neben den Kosten eines der Hauptprobleme der phänotypischen Resistenztests, die mindestens um die Hälfte von den genotypischen Verfahren unterboten wird. Während eine Sequenzierung in einer Woche zu einem Preis von 360 € abgeschlossen werden kann, sind 4 Wochen und ca. 1000 € für einen phänotypischen Resistenztest im üblichen Rahmen (<http://www.monogramhiv.com/>).

1.5 RT-Aktivitäts Assays

1.5.1 Methoden

Alle Methoden der Bestimmung der RT-Aktivität basieren auf der Funktion der DNA-Generierung aus einer RNA-Vorlage. Sowohl die Art der RNA als auch die Art des DNA-Nachweises unterscheiden sich in den verschiedenen Verfahren erheblich.

1.5.1.1 Verfahren mit Nachweis durch markierte Nukleotide

Nachweisverfahren mit Verwendung markierter Nukleotide sind gut etabliert und schnell in der Durchführung.

Als Template dient meist eine homopolymere Ribonukleinsäure, die deshalb keine Sekundärstrukturen ausbildet und somit kaum angreifbar durch RNAsen ist. Zusätzlich sind in der Reaktionsmischung neben Puffersubstanzen und Salzen ein sequenzkomplementärer Primer (Oligonukleotid) und das komplementäre DNA-Nukleotid. Ein Teil der Nukleotide ist markiert und bildet im Verlauf der Reaktion eine markierte DNA.

Diesem prinzipiellen Aufbau folgen am einfachsten die radioaktiven Assays mit Einbau von tritiierten Nukleotiden und anschließender Fällung der entstandenen DNA auf einem Filter. Durch Messung der Radioaktivität des Filters kann auf die Menge an markierter DNA und somit auf die Menge an aktiver RT geschlossen werden. Diese Verfahren sind auch weiterhin in Verwendung und stellen in optimierter Form den Standard der konventionellen RT-Assays dar (Sears 1999).

Weitere Verfeinerungen dieses Verfahrens erlauben nicht nur einen Verzicht auf Radioaktivität, sondern auch eine Steigerung der Sensitivität. Dies konnte vor allem durch Kopplung mit Farbstoff- oder Chemolumineszenz-erzeugenden Systemen erreicht werden (Eberle 1992, Odawara 2002).

1.5.1.2 Verfahren mit Nachweis durch PCR-Amplifikation

Weitaus sensitivere Verfahren zum RT-Nachweis stellen die Verfahren dar, die ein heteropolymeres RNA-Template in eine DNA umschreiben lassen, um diese dann in einem folgenden PCR-Schritt nachzuweisen. Diese Verfahren sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden im Methodenteil noch ausführlich besprochen.

1.5.2 Verwendung

Der Nachweis von RT-Aktivität wird am häufigsten eingesetzt, um die Produktion von Retroviren in der Zellkultur zu bestätigen und zu quantifizieren.

Die neueren PCR-basierten Verfahren schaffen sich momentan einen Platz beim Nachweis von Kontamination von Impfstoffen und in der HIV-Diagnostik.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Verbesserung der bereits bestehenden PCR-basierten RT-Aktivitäts Assays in Bezug auf Handhabung, Sensitivität, Spezifität und Verknüpfung mit einer raschen Quantifizierung des Messergebnisses. Die bisherigen Verfahren sind zwar, was die Sensitivität betrifft, hoch optimiert, doch dies nur zum Preis einer teilweise drastisch reduzierten Spezifität, vor allem in Bezug auf zelluläre DNA-Polymerasen. Um eine diagnostische Verwendung zu ermöglichen, wurde besonders auf die Kontaminationssicherheit Wert gelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Prinzipieller Ablauf des Tests

Grundsätzlich lässt sich das Testverfahren in drei Teile zerlegen:

1. RT in der Probe erzeugt cDNA aus einer vorgegebenen Menge an RNA.
2. Amplifikation der in Schritt 1 erzeugten cDNA mittels PCR.
3. Nachweis der entstandenen DNA mit diversen Verfahren (Agarose-Gel-Elektrophorese und Nachweis von DNA mit Ethidiumbromid, Sonden-Hybridisierung).

Die Schritte 2 und 3 können bei einer Realtime-Quantifizierung zu einem Schritt zusammengefasst werden.

Der grundsätzliche Ablauf wurde bereits von Pyra und Boeni (Pyra 1994, Boeni 1996), Heneine (Heneine 1995) und Silver (Silver 1993) beschrieben und entspricht weitgehend dem Ablauf einer RT-PCR, nur mit dem Unterschied, dass eine bekannte Menge an Template-RNA vorhanden ist und eine unbekannte Menge an RT hinzugefügt wird. Bei im Überschuss vorhandenem RNA-Template ist die Menge an entstehender cDNA von der eingesetzten Menge an RT abhängig. Über eine Quantifizierung der cDNA kann dadurch die Menge bzw. Aktivität an RT im Reaktionsansatz bestimmt werden.

2.2 Zellen und Zellkultur

2.2.1 Spender-PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells)

PBMCs wurden mittels Ficoll®-Gradientenzentrifugation aus Blutspenden von Mitarbeitern des Max v. Pettenkofer-Institutes gewonnen und unter Standardbedingungen (RPMI 1640, 10% fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und Interleukin-2) nach intermediärer Stimulierung mit Phythämagglutinin für bis zu 3 Wochen kultiviert.

2.2.2 H9-Zellen

H9-Zellen (Subklon H9 der permanenten T-Zell-Lymphomlinie HUT78) werden als Dauerkultur unter Standardbedingungen (RPMI 1640, 10% fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin) kultiviert.

2.3 Quellen für RT

2.3.1 Zellkulturüberstände

2.3.1.1 Dauerkulturen

Ein Großteil der Versuche wurden mit einem im Max von Pettenkofer – Institut auf H9-Zellen angezüchteten HIV-Laborstamm (MvP-899, HIV-1/M Subtyp B) durchgeführt.

Frischer Zellkulturüberstand wurde mit Lysispuffer (s. Tabelle 3) 30 Min. bei 37°C lysiert und sofort weiterverarbeitet. Dieses Vorgehen verhindert eine Beeinflussung der RT-Aktivität durch Einfrieren und Auftauen.

Tabelle 2: Reaktionspufferkonzentration

5-fach konzentrierter Reaktionspuffer (5R10M10T)

Substanz	Molarität
KCl	250 mM
Tris-HCl pH 8,3	50 mM
MgCl ₂	50 mM
EGTA	4 mM
DTT	50 mM

Tabelle 3: Lysisreagenz

Lysisreagenz (Verwendung: 30 µl Lysisreagenz + 70 µl Probe)

Substanz	Menge	Kommentar
5R10M10T (s. Tabelle 2)	20 µl	
10% Triton X-100	2 µl	Endkonzentration 0,2 %
H ₂ O	8 µl	

2.3.1.2 Anzucht von Subtypen und resistenter Stämme

Mittels Kokultivierung von PBMCs wurde das HIV-Isolat MvP-08801-99 angezüchtet. Dieses Virus ist gegen alle zur Zeit in klinischer Anwendung verfügbaren RT-Inhibitoren resistent. In Tabelle 5 werden die mittels partieller Sequenzierung im Bereich des pol-Gens festgestellten Mutationen in der üblichen Notation (s. Tabelle 4) im Vergleich zu HXB-2 dargestellt. Es werden nur Mutationen mit bekannter Resistenzassoziation aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mit den in Tabelle 7 angegebenen Algorithmen. In Tabelle 6 ist das Ergebnis der Algorithmen zu sehen. Die Angabe in der Tabelle erfolgt entweder als Resistenzfaktor oder als Resistenzgrad (sensibel, intermediär oder resistent).

Tabelle 4: Notation Resistenzen:

1. Stelle: Aminosäure von HXB-2
2. Stelle: Position der Aminosäure
3. Stelle: von HXB-2 abweichende Aminosäure

Tabelle 5: Mutationen MvP-08801-99

Protease	L10I, M36I, L63P, A71V, I84V
RT	A62V, K65R, T69I, V75I, F77L, K101E, Y115F, F116Y, V118I, Q151M, Y181C, G190A, K219Q

Tabelle 6: Analyse des Pol-Fragments vom Start der Protease bis Aminosäure 333 der RT von MvP-08801-99

	ADRA (Resistenzfaktor)	Stanford	geno2pheno
AZT	10	resistent	resistent
DDI	4-10	resistent	resistent
DDC	4-10	resistent	resistent
D4T	resistent	resistent	resistent
3TC	resistent	resistent	resistent
Abacavir	3	resistent	resistent
Tenofovir	10-25	resistent	resistent
Nevirapin	>100	resistent	resistent
Delavirdin	>100	resistent	resistent
Efavirenz	>100	resistent	resistent

Tabelle 7: Resistenzalgorithmen

ADRA	Vergleich von Sequenz und beschriebenen resistenzassoziierten Mutationen in der Literatur/ Los Alamos National Library http://hiv-web.lanl.gov/
Stanford	Statistische Methode und Vergleich von Sequenz und beschriebenen resistenzassoziierten Mutationen in der Literatur http://hivdb.stanford.edu
geno2pheno	Vorhersage des Phänotyps anhand eines erlernten Entscheidungsbaums, basierend auf bekannten Genotyp-Phänotyp Korrelationen http://www.geno2pheno.org

2.3.2 Rekombinante HIV-RT

Rekombinant im E.coli-System exprimierte RT diente zur absoluten Quantifizierung und als positive Kontrolle (RT HIV-1, Roche Biochemicals, Art.-Nr.: 1465333).

2.3.3 Patientenplasma

Ein Teil der Versuche wurde mit HIV-positiven Patientenplasmen durchgeführt. Dazu wurden überschüssige Plasmavolumina nach Abschluss der Viruslastbestimmung und definitiver Anonymisierung aus der Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts benutzt. Die Bestimmung der Viruslast erfolgte mit dem Cobas Amplicor Monitor® von Roche Diagnostics.

2.4 Reverse Transkription

2.4.1 Auswahl von Template und Primern, Reaktionsbedingungen

Die Auswahl des Templates ist von entscheidender Rolle. Ein homopolymeres Template (z.B. poly-A) ist einfach und billig synthetisch herzustellen, ist unempfindlich gegen RNAsen und bildet keine Sekundärstrukturen. Eine Signalamplifikation mittels PCR ist jedoch aufgrund der Sequenzspezifität des PCR-Verfahrens nicht möglich.

Um eine Signalamplifikation mittels PCR anschließen zu können, muss ein heteropolymeres Template verwendet werden. Auch für die Überprüfung auf Sensibilität gegenüber verschiedenen Inhibitoren, im speziellen Strang-Terminatoren, müssten vier unterschiedliche homopolymere Templates, entsprechend dem zugrunde liegenden Nukleotid, verwendet werden.

Eine Möglichkeit wäre das Erzeugen eines heteropolymeren RNA-Templates mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen anhand eines vorhandenen DNA-Templates und anschließender Aufreinigung (z.B. selektiver DNA-Verdau). So könnte eine optimierte Sequenz verwendet werden mit wenig Sekundärstrukturen und optimalen Primer- und Sondenbindungsstellen. Eine inkomplette Aufreinigung würde in diesem Fall jedoch die Gefahr einer Kontamination (DNA-Reste und Reste von DNAsen) in sich tragen. Dies könnte zu falsch positiven, wie auch falsch negativen Ergebnissen führen.

Ein heteropolymeres RNA-Template komplett synthetisch herzustellen ist teuer und kann durch Verwendung von RNA eines in der Natur vorkommenden RNA-Virus, das in seiner kompletten Replikation keine DNA-Zwischenstufe besitzt, umgangen werden. Hierfür bie-

ten sich Viren aus der Gruppe der plus-Strang RNA Viren an. Vertreter wären hier u.a. Levivirus Enterobacteriophage MS2 (im weiteren MS2) oder das Tobamovirus Tobacco Mosaic Virus (TMV, Tabakmosaikvirus), die beide den Vorteil haben, in ausreichender Menge im Handel erhältlich zu sein. Angelehnt an Pyra (Pyra 1994) wurde für die im Rahmen der Promotion durchgeführten Versuche RNA von MS2 verwandt (MS2-RNA, Roche Biochemicals, Best-Nr.10165948001).

Problematisch bei der Verwendung eines heteropolymeren Templates ist nicht nur die Angreifbarkeit durch RNAsen, auch die ausgeprägten Sekundärstrukturen stellen ein erhebliches Problem bei der Auswahl der nötigen Primer dar. So können Stellen, die für die Auswahl von Primern auf den ersten Blick hervorragend geeignet scheinen, aufgrund von Dimer-Bildung und eigenen Sekundärstrukturen vollkommen ungeeignet sein.

Prinzipiell könnte die Umschreibung von RNA nach DNA auch mit einem sequenzunspezifischen Primer erfolgen (Random Hexamer). Diese Methode wurde nicht gewählt, da im Verlauf der Untersuchungen die Option erhalten werden sollte, die Aktivität der RT im Verlauf des Templates zu beobachten. Im speziellen Fall sollte es eine Möglichkeit geben, die Abnahme der Menge an generierter cDNA nach ca. 1000 Basen Schreiblänge, nach 2000 Basen Schreiblänge und nach 3000 Basen Schreiblänge zu bestimmen. Deshalb wurde, um ein möglichst langes Stück an cDNA zu erzeugen, ein Primer am 3'-Ende der MS2-RNA gewählt (Abbildung 7: Ablauf des RT-Schritts). Der Primer wurde nach optimaler Schmelztemperatur, geringer Ausbildung von Sekundärstrukturen und möglichst einmaligem Vorkommen im RNA-Genom ausgewählt. Besonderes Augenmerk wurde auch auf die Vermeidung der Ausbildung von Dimeren mit den PCR-Primern gelegt, da der RT-Primer als Kontamination im PCR-Schritt weiter vorhanden ist und die Effektivität der PCR nicht beeinflussen sollte. Als Alternative zu dem ersten gewählten Primer RT 3529 wurde der Primer PRT 3543 erprobt (s. Tabelle 12: RT-Primer).

Der Unterschied zu den bisher publizierten RT-Assays mit Amplifikationsschritt ist das deutlich größere Fragment, das durch die RT umgeschrieben werden muss, bevor ein PCR-Produkt detektiert werden kann. So wird bei den bisherigen Assays, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, eine Schreibstrecke von höchstens 200 Nukleotiden gefordert.

Vor Beginn des RT-Schritts muss erst die RNA linearisiert werden, gefolgt vom Anlagern des RT-Primers. Danach beginnt der eigentliche RT-Reaktionsschritt (s. Tabelle 8: Ablauf RT-Schritt, Tabelle 9: Reaktionsbedingungen Annealing).

Die Reaktionsbedingungen wurden aufbauend auf die Arbeiten von Pyra (Pyra 1994), Chang (Chang 1997) und Maudru (Maudru 1997) gewählt und optimiert (s. Tabelle 11: Reaktionsansatz RT-Schritt).

Tabelle 8: Ablauf RT-Schritt

Abschnitt	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Annealing			
	Linearisieren	95	15
	Inkubieren	37	30
	Stoppen	<i>auf Eis</i>	<i>> 5 bis Weiterverwendung</i>
RT-Schritt			
	Inkubieren	37	240-1200
	Stoppen	95	7
	Kühlen	< 4	<i>bis Weiterverwendung</i>

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen Annealing

Primer/Template Mischung

Konz.	Substanz
0,26 µM	MS2-RNA
9 µM	RT-Primer
2,5 mM	DTT
0,4 U/µl	RNAse-Inhibitor

Tabelle 10: Nukleotid-Mix RT-Schritt

Nukleotid-Mix (100 µl):

Nukleotid	M der Stammlsg	Menge	+ Wasser	End-Molarität
dATP	100 mM	3 µl		3 mM
dTTP	100 mM	3 µl		3 mM
dCTP	100 mM	3 µl		3 mM
dGTP	100 mM	3 µl		3 mM

88 µl

Tabelle 11: Reaktionsansatz RT-Schritt

Einfachreaktionsansatz RT-Reaktion

6 µl Puffer 5R10M10T
 3 µl Primer/Template Mischung
 6 µl Nukleotid-Mix (s. Tabelle 10)
 14,1 µl Wasser (a.d.)

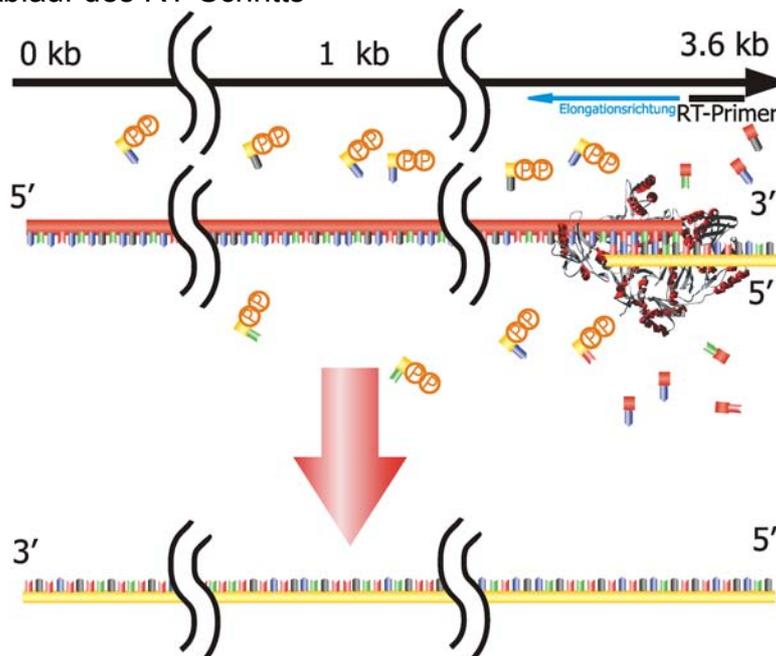
0,9 µl RNase-Inhibitor (40 Units/µl)
 60 µl Lysat

90 µl RT-Reaktionsgemisch Gesamtmenge

Tabelle 12: RT-Primer (Berechnung der Schmelztemperaturen im weiteren mit Netprimer von Premier Biosoft <http://www.premierbiosoft.com>)

Oligonukleotid	5'	3'	T _m [°C]
Rt 3529	CAg CTA gTT ACC AAA TCg ggA g		60,4
Prt 3543	gTA ACT AgC CAA gCA gCT AgT		61,5

Abbildung 7: Ablauf des RT-Schritts



2.4.2 Inhibition mit AZT und 3TC

Versuche zur Resistenz gegen AZT und 3TC wurden mit Hilfe der aktiven Metabolite (Reinsubstanz wurde dabei von Glaxo Wellcome zur Verfügung gestellt; die aktiven Metaboliten von Roche Biochemicals daraus synthetisiert) an dem bereits vorher genannten multiresistenten Virusstamm durchgeführt. Hierzu wurde in unterschiedlicher Konzentration AZT-Triphosphat und 3TC-Triphosphat dem RT-Schritt hinzugefügt. AZT-TP und 3TC-TP waren auch in geringerer Konzentration im PCR-Schritt vorhanden, da, um Verluste durch Aufreinigung zu verhindern, das Produkt des RT-Schrittes direkt in die PCR eingesetzt wurde. Um eine Inhibition des PCR-Schritts durch AZT-TP- oder 3TC-TP-Reste zu detektieren, wurden zusätzlich Proben ohne Inhibitor im RT-Schritt, dafür aber mit Inhibitor im PCR-Schritt untersucht.

2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.5.1 Ablauf der PCR

Der Ablauf der PCR wird hier kurz zusammengefasst, da sich hieraus Konsequenzen für den Einsatz der Realtime-Quantifizierung ergeben:

1. Denaturierung: Temperaturerhöhung auf Bereiche um 95°C; Nukleinsäuren sind einzelsträngig, Sekundärstrukturen sind aufgelöst.
2. Annealing: Temperaturen um die 55°C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer); Anlagerung der Primer
3. Elongation: Temperaturen um die 72°C (abhängig vom Aktivitätsoptimum der verwendeten thermostabilen Polymerase

Im Rahmen bestimmter Protokolle können die Schritte 2 und 3 zusammengefasst werden.

Beim PCR-basierten RT-Assay wird das Produkt des RT-Schritts zusammen mit den weiteren Reagenzien für die PCR zusammengebracht. Da viele thermostabile Polymerasen unter bestimmten Bedingungen zumindest in geringem Ausmaße über eine intrinsische RT-Aktivität verfügen, müssen falsch positive Ergebnisse durch einen Verdau der restlichen Template-RNA vermieden werden. Dies wird durch Inkubation mit RNase erreicht (RNase DNase frei, Roche Biochemicals, Art.Nr.: 1119915). Eine weitere Möglichkeit um

unspezifische Reaktionen zu vermeiden, ist die Verwendung einer Polymerase, die erst nach thermischer Aktivierung funktionsfähig wird (s. auch 2.5.3).

Die verwendeten Protokolle werden in den folgenden Tabellen (13,14,15,16 und 17) dargestellt.

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen Amplitaq Gold

100 µl Reaktionssansatz

Endkonz.	Substanz	
10 mM	Tris-HCl pH 8,3	
50 mM	KCl	
10 mM	DTT	
0,8 mM	EGTA	
3,0 mM	MgCl ₂	
0,025 U/µl	Amplitaq Gold	
0,01 U/µl	thermolabile UNG	
5 ng/µl	RNAse DNase-frei	
je 1,0 µM	Primer	
je 0,2 mM	ATP; CTP GTP	
0,6 mM	UTP	
		in 70 µl Volumen
	cDNA aus RT-Schritt	+ 30 µl

Tabelle 14: 1xAnsatz für den LightCycler

Reaktionsvolumen 20 µl

Vol. [µl]	Substanz	Bemerkung
2	Master-Mix	Bei Hotstart mit Taq-Antikörpern: 2µl Master-Mix + 0,16 µl TaqStart-AK unverdünnt s. 2.5.3; Korrektur mit 0,16 µl weniger a.d. pro Ansatz
1,2	Beacon 10 mM	
1	UNG 1U/µl	
1,5	RNAse DNase-frei 0,5 µg/µl	
2	Primer 10mM	
2,3	a.d.	
		in 10 µl Volumen
	cDNA aus RT-Schritt	+ 10 µl

Tabelle 15: PCR-Schritt mit Amplitaq Gold

Abschnitt	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
RNAse Verdau des restlichen RNA- Templates, De-Uraci- lierung, Aktivieren der Amplitaq Gold	RNA Verdau und	37	1800
	Deuracilierung		
	Denaturierung	95	600
Amplifikation	Denaturierung	95	30
35 Zyklen	Annealing	55	30
	Elongation	72	30
Post-PCR	letzte Elongation	72	600
	Kühlen	< 4	bis Weiterverwendung

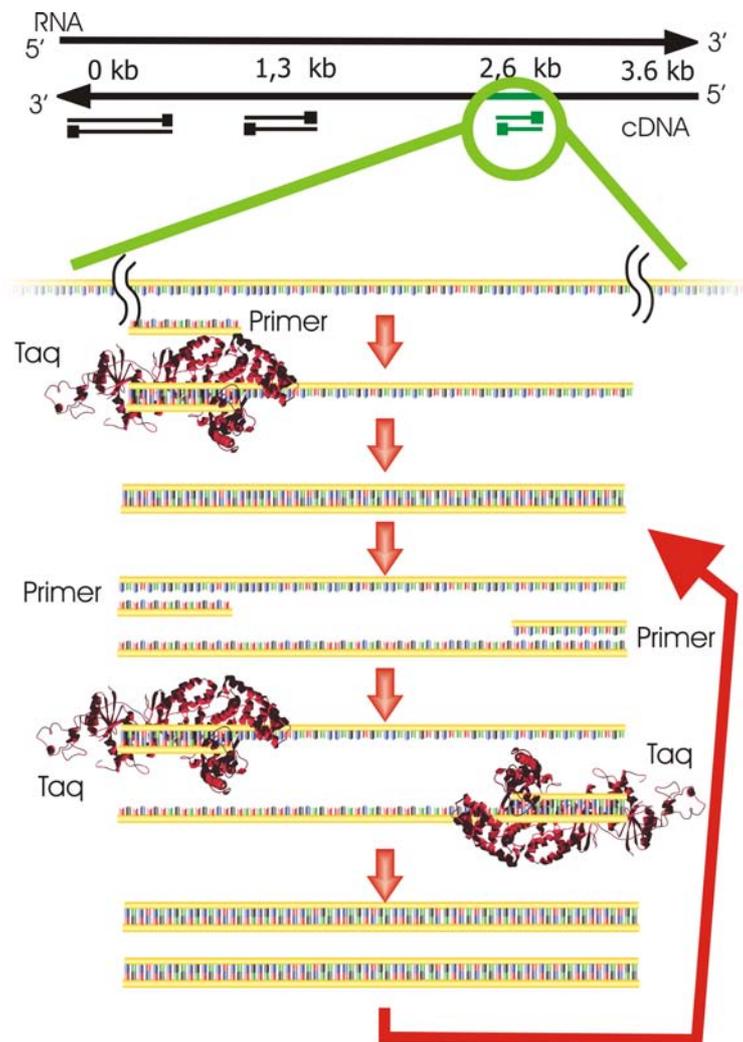
Tabelle 16: PCR-Schritt mit LightCycler DNA Master und Taq-Antikörper

Abschnitt	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
RNAse Verdau des restlichen RNA- Templates, De-Ura- cilierung, Aktivieren der Polymerase	Deuracilierung	<i>Raumtemperatur</i>	300
	Verdau	40	300
	Denaturierung	95	60
Amplifikation	Denaturierung	95	1
45 Zyklen	Annealing	55	5 (Messpunkt Beacon)
	Elongation	72	5 (Messpunkt SYBR Dye)
Post-PCR (SYBR Dye)	Schmelzkurve	55-95	<i>Temperaturänderung</i> <i>0,1 °C/s</i>
	Kühlen	< 4	<i>bis Weiterverwendung</i>
Post-PCR (Beacon, bzw. Hy- bridisierungs-sonde)	Kühlen	< 4	<i>bis Weiterverwendung</i>

Tabelle 17: PCR-Schritt mit LightCycler DNA Master

Abschnitt	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
RNase Verdau des restlichen	Deuracilierung	<i>Raumtemperatur</i>	300
	Verdau	40	300
RNA-Templates, Deuracilierung, Ak- tivieren der Poly- merase	Denaturierung	95	300
Amplifikation 45 Zyklen	Denaturierung	95	5
	Annealing	55	5 (Messpunkt Beacon)
	Elongation	72	5
Post-PCR (SYBR Dye)	Schmelzkurve	55-95	(Messpunkt SYBR Dye) <i>Temperaturänderung</i> 0,1 °C/s
	Kühlen	< 4	<i>bis Weiterverwendung</i>
Post-PCR (Beacon bzw. Hybridisie- rungs-sonde)	Kühlen	< 4	<i>bis Weiterverwendung</i>

Abbildung 8: Schematische Darstellung des PCR-Schritts



2.5.2 Auswahl der Primer

Zur Auswahl der Primer wurde das Programm Primer Express von Applied Biosystems verwendet. Die Primer wurden für eine potenzielle Multiplex-PCR ausgewählt und zeigen nur sehr geringe Neigung zur Dimer-Bildung untereinander. Insgesamt wurden 3 Paare von Primern mit verschiedenen Zielen ausgewählt. Aus der Position der Ziele in der MS2-Sequenz lassen sich die verschiedenen Mindest-Längen von RNA errechnen, die revers transkribiert werden müssen. Ein Ziel liegt bei ca. 0,1 kb (Primer PI und Pli) da der RT-Primer bei 3,5 kb bindet ergibt sich eine Mindestlänge von RNA die umgeschrieben werden muss von 3,4 kb. Ein weiteres Ziel befindet sich bei 1,2 kb und ein drittes bei 2,6 kb (Positionsangaben bei Zählung von 5' nach 3' an MS2-Sequenz LEMS2X aus der EMBL-Da-

tenbank). Um bei einer Gel-elektrophoretischen Analyse die PCR-Produkte unterscheiden zu können, wurde bei der Auswahl der Primer zusätzlich auf eine unterschiedliche Länge der PCR-Produkte geachtet.

Tabelle 18: Verwendete PCR-Primer und Sonden

Oligonukleotid	5'	3'	T_m [°C]
PI 145	ACC CTT gAT Agg gAg AAC gAg A		59,8
Pli 402	gTC gAg ggA gAA gCC gAA A		57,9
Pm 1255	TCg ATg gTC CAT ACC TTA gAT g		52,7
Pmi 1464	gAC gAA CgC TAC Agg TTA CTT T		63,5
Pk 2638 auch digoxygeniert als Pk 2638dig	TAg ATg gCg AgA CgA TAC gAT g		56,3
Pki 2716 auch biotinyliert als Pki 2716bio	gTC gCT TTg ACT ATT gCC CAg A		61,1
Rt 3529	CAg CTA gTT ACC AAA TCg ggA g		60,4
Prt 3543	gTA ACT AgC CAA gCA gCT AgT		61,5
PertK2322	gTT gTA ggg AAC ggA gTg TTT		60,8
PertKi2440	TAT ACC AAC ggA TTT gAg CC		54,7
PertSKi2419	LC-Red640-TCg gTg CTT TCA TCA gAC gC-p		60,7
PertSK2393	TAT gAA TAT gTA CCT CCA gAA Agg g-Fluorescein		55,4

Tabelle 19: PCR-Produkte

Name des PCR-Produkts	Primer-kombination	Länge des PCR-Produkts	Position LEMS2X (Mindest-umschreiblänge)
Pk	Pk und Pki	101 bp	2,6 kb (0,9 kb)
Pm	Pm und Pmi	232 bp	1,2 kb (2,3 kb)
Pl	Pl und Pli	277 bp	0,1 kb (3,4 kb)
Pl*	Pl und Rt 3529	125 bp	3,5 kb (0,1 kb)

2.5.3 HotStart Methode

Der Begriff HotStart-PCR bezeichnet eine PCR-Methode, bei der die thermostabile Polymerase erst nach der ersten Denaturierung hinzugefügt oder aktiviert wird. Techniken um dies zu erreichen sind z.B. das Einbringen einer Wachsschicht zwischen der Polymerase in ihrem Lösungsmittel und dem restlichen Reaktionspuffer mit Primern und Template. Bei Erreichen der Denaturierungstemperatur wird das Wachs flüssig und ermöglicht das Vermischen der Reagenzien. Dieses in der praktischen Anwendung sehr aufwändige Verfahren wurde durch zwei Methoden ersetzt. Die erste Methode ist die Benutzung von inhibierenden Anti-Taq Antikörpern zur Blockierung der Polymerase. Diese Antikörper sind nur bis zu einer bestimmten Temperatur stabil und werden bei einer Temperatur von 95°C inaktiviert. Eine ebenso elegante Methode ist die Verwendung von chemisch modifizierter Taq-Polymerase, die erst nach einer kurzen Aufheizphase (Dauer vom Enzym abhängig) in aktiver Form vorliegt.

Im Rahmen der Experimente wurde Amplitaq Gold (Applied Biosystems Art.Nr.: 4311806), Polymerase aus dem FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix (Roche Biochemicals, Art.Nr.: 3003248) und DNA Master Mix (Sybr Green I und Hybridization probes) sowie der α -Taq Antikörper TaqStart™ (Clontech, Art.-Nr.: 5400-1) benutzt.

2.5.4 Dekontaminations-Strategie mit Uracil-N-Glycosylase (UNG)

Ein wichtiges Problem bei der Durchführung von PCRs in einem diagnostischen Setting ist die Vermeidung von Kontaminationen der Ausgangsreagenzien mit PCR-Produkten, da diese das optimale Ausgangsprodukt für eine neue PCR darstellen. Hier spielen die Verdünnung etwaiger Inhibitoren, bereits angepasste Salzkonzentrationen und eine optimale Bindung der Primer an ihre Bindungsstellen eine Rolle. Neben räumlicher Trennung der Schritte „Ansetzen der Reaktionslösungen“, „Hinzufügen der Template-DNA“, „Benutzung der Thermocycler“ und „Detektion“ ist eine weitere Unterstützung das Benutzen einer biochemischen Dekontamination.

Als biochemische Dekontamination hat sich das UNG/dUTP-Verfahren durchgesetzt. Hierbei wird in der PCR dTTP gegen das in der Natur als DNA-Baustein nicht vorkommende dUTP ausgetauscht. Da dUTP kein optimales Substrat ist, wird die Konzentration im Reaktionsgemisch der PCR meist auf ein Verhältnis A:C:U:G von 1:1:3:1 bis 1:1:6:1 eingestellt. In der PCR entstehen in der Folge nur noch Produkte, die anstelle eines Thymidins ein Uridin in der Sequenz enthalten und somit, als aus einer PCR-Reaktion stammend, markiert sind. Falls nun bei einer nächsten PCR-Reaktion Ausgangsreagenzien mit dieser markierten DNA kontaminiert wurden, kann ein Inkubationsschritt mit UNG diese Kontamination aus der Reaktion entfernen. Während des Inkubationsschrittes wird, durch Entfernen der Uracil-Base vom Deoxy-Ribose Grundgerüst des eingebauten Uridins, eine Hitze- und Alkali-empfindliche Lücke im DNA-Strang geschaffen, welche beim ersten Denaturierungsschritt der PCR-Reaktion zu einem Fragmentieren des Strangs führt. Uridin-freie DNA wird von dieser Reaktion nicht betroffen. Eine Kombination mit einem HotStart Verfahren bietet sich an, um einen Beginn der PCR-Reaktion vor Beendigung der Dekontamination zu verhindern.

UNG ist im Handel in zwei Varianten erhältlich. Ein (relativ) hitzeresistentes Enzym von *E. coli* (AmpErase, Applied Biosystems, Art.-Nr.: N808-0096) oder als thermolabiles Enzym von marinem Bakterium BMTU 3346 (Roche Biochemicals, Art.-Nr.:1775375). Die thermolabile Variante hat den Vorteil einer stabileren Nutzung der PCR-Produkte in nachfolgenden Tests. Bei der thermostabileren *E. coli* UNG ist auf die Vermeidung des Absinkens der Reaktionstemperatur unter 50°C nach der anfänglichen Dekontamination zu achten. Sonst wird bereits neu entstandenes PCR-Produkt wieder verdaut. Diese Probleme bestehen bei thermolabiler UNG nicht.

2.6 Nachweis von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Zum Größenvergleich wurden die DNA Molecular Weight Marker V und VIII von Roche Biochemicals benutzt (Bestellnummer 821705 und 1336 045).

2.7 Quantifizierung von PCR-Produkten

Zur Quantifizierung von PCR-Produkten stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich unterscheidet man in Endpunktsbestimmungen und Real-Time-Quantifizierung. Beide Methoden haben ihre Vorteile und Nachteile. Die Real-Time-Quantifizierung ist das neuere und schneller durchzuführende Verfahren. Sie benötigt im Gegensatz zur Endpunktbestimmung aber spezielle Geräte, die über ein eingebautes Fluorimeter verfügen

2.7.1 Endpunktsbestimmungen

Bei der Endpunktbestimmung beendet man nach einer bestimmten Zyklenanzahl die PCR. Das richtige PCR-Produkte kann z.B. über Sondenhybridisierung anhand seiner spezifischen Sequenz nachgewiesen werden. Die Hybridisierungssonde ist markiert und kann über ein nachgeschaltetes Detektionssystem quantifiziert werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden teilweise Endpunktsbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden der Primer P_k mit Biotin, der Primer P_k mit Digoxigenin markiert. Das nach 35 Zyklen entstandene, doppelt markierte PCR-Produkt kann über die Biotin-Gruppe an eine mit Streptavidin gecoatete Oberfläche (96 Well-Platte schwarz, Roche Biochemicals, Best.Nr.: 1 734 784) gebunden werden, was eine Entfernung verschiedener Störfaktoren (Überschüssige Primer, Reste des PCR-Puffers) durch Waschschriffe ermöglicht (Zusammensetzung des Waschpuffers s. Tabelle 20). Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde nun die Digoxigenin-Markierung benützt. Mit Meerrettich-Peroxidase verknüpfte Fab-Fragmente eines Anti-Digoxigenin Anti-Körpers (Anti-DIG-POD, Roche Biochemicals, Best.Nr.:11207733910) binden an diese Markierung und setzen nach einem weiteren Waschschriffe ein Chemolumineszenzsubstrat (Luminol/Iodophenol gebrauchsfertig, Roche Biochemicals, Best. Nr.:1582950) in die lumineszierende Form um. Je mehr DNA am Beginn der PCR vorhanden ist, um so mehr PCR-Produkt ist zu einem, noch nicht in der Sät-

tigung liegenden Zeitpunkt vorhanden. Diese Menge an DNA ist nun wiederum proportional zur Menge des durch Chemolumineszenz emittierten Lichts. Die Intensität der Chemolumineszenz wurde mittels eines Chemolumineszenz-Readers in RLU (Relative Light Units) ermittelt (Ablauf s. Tabelle 21).

Tabelle 20: Zusammensetzung 10xWaschpuffer für Endpunktmessung:

Substanz	Konzentration
Na-citrat	150 mM
NaCl	1,55 M
Tween 20	0,1% (v/v)

Tabelle 21: Ablauf Endpunktsbestimmungen

Schritt	Reagenz	Dauer
Inkubation	50 µl RT-Produkt	1 h
Waschen	Waschpuffer	5 mal Waschen
Inkubation	Anti-Dig-POD 200 mU/ml	1 h
Waschen	Waschpuffer	5 mal Waschen
Inkubation	Luminol/Iodophenol-Substrat	3 min
Messen		Innerhalb von 30 min

2.7.2 Real-Time-Quantifizierung

Die Real-Time-Quantifizierung erreicht ihre außerordentlich langen linearen Messbereich (bis zu 6 log₁₀-Stufen) durch kontinuierlich Messung eines je nach PCR-Produktmenge zunehmenden Fluoreszenzsignals während der Amplifikation. Bestimmt wird dabei der Cycle Threshold (CT), also der Zeitpunkt, ab dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Cutoff-Wert überschritten hat. Je mehr DNA am Anfang in der Reaktion vorhanden ist, desto früher wird der Cutoff-Wert überschritten. Mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe kann das Ergebnis in eine Quantität umgerechnet werden. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich prinzipiell nur durch die Erzeugung der Fluoreszenz.

Das bekannteste Verfahren zur Erzeugung von Fluoreszenz für Real-Time-Quantifizierungen ist die TaqMan-Methode, auch als 5'-Exonuclease-Assay bezeichnet. Das TaqMan-

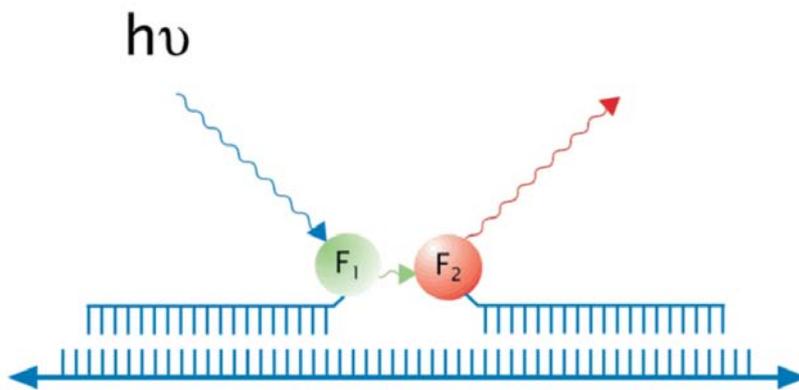
Verfahren stellt jedoch bestimmte Ansprüche an das Primer- und Sondendesign, die in der Umsetzung sehr schwierig geworden wären. Statt dessen wurden die unten genannten Verfahren zur Real-Time-Quantifizierung benutzt. Ein quantifizierter, auf dem TaqMan-Verfahren basierender PERT wurde von Maudru 1998, von Arnold 1998 und von Lovatt 1999 beschrieben.

2.7.2.1 SYBR Dye Green I

SYBR Dye Green I ist im Gegensatz zu den anderen Verfahren sequenzunabhängig. Nur wenn SYBR Dye Green I zwischen DNA-Doppelstränge interkaliert wirkt es als Fluorophor. Je mehr PCR-Produkt entsteht, umso mehr Moleküle SYBR Dye Green I können interkalieren und umso mehr messbare Fluoreszenz entsteht. Fluoreszenz entsteht aber auch bei Interkalation mit Primer-Dimeren oder unspezifischen Produkten der PCR. Eine anschließende Bewertung der Schmelztemperaturkurven der PCR-Produkte, die im Light-Cycler auf sehr einfache Weise durchgeführt werden kann, erlaubt die Unterscheidung zwischen dem gesuchten Produkt und unspezifischen, falschen Produkten. Bei hohem Anteil an unspezifischen Produkt kann aber nicht abgeschätzt werden, ab welchem CT-Wert das spezifische Produkt und ab welchem das unspezifische Produkt positiv wird, was eine Quantifizierung in diesem Fall unmöglich macht. Vorteilhaft ist der günstigere Preis, im Vergleich zu Sondenformaten und die schnelle Überprüfung der Eignung bestimmter Primer für eine Realtime-PCR. SYBR Dye ist bereits im LightCycler – DNA Master SYBR Green I enthalten. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt zu dem Zeitpunkt, an dem am meisten doppelsträngige DNA vorhanden ist, nämlich am Ende der Elongationsphase und vor dem nächsten Denaturierungsschritt.

2.7.2.2 FRET-Hybridisierungssonden

Abbildung 9: FRET-Sonden



F₁:Fluorescein; F₂:LC640

(<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler>)

Das primäre Sondenformat für den LightCycler ist die Benutzung von zwei Hybridisierungssonden, von denen eine mit dem Fluorophor LC-Red 640 oder LC-Red 705 markiert ist, die andere mit Fluorescein. Einzeln angeregt emittieren die Sonden mit der ihnen spezifischen Wellenlänge. Diese spezifische Wellenlänge der einzelnen Sonden wird bei Bestimmung des CT-Wertes nicht berücksichtigt. Binden jedoch beide Sonden an das PCR-Produkt, kommen beide Sonden in ausreichende Nähe zueinander. Es kommt so zur Fluoreszenz-Resonanzübertragung und Emission von Lichtquanten in einer verschobenen Wellenlänge, die nun nachgewiesen wird. Nur Licht dieser Wellenlänge wird für die Bestimmung des CT-Wertes benutzt. Diese Methode ist hochspezifisch und besitzt von der Fluoreszenz her einen sehr guten Signal-Rausch-Abstand. Limitierend ist jedoch die freie Sequenzlänge zwischen den beiden Primern, da zwei direkt neben einander liegende Sondenbereiche mit circa 25 Nukleotiden Länge in diesem Bereich gefunden werden müssen. Das durch P_k und P_{ki} erzeugte PCR-Produkt bietet aufgrund der kurzen Länge keine Möglichkeit der Detektion durch FRET-Hybridisierungssonden. Stattdessen wurden die Primer P_{ertK} und P_{ertKi} zusammen mit den Sonden P_{ertSK} und P_{ertSKi} benutzt. Das etwas längere PCR-Fragment zeigte jedoch eine deutlich schlechtere Effektivität und eine erste Austestung mit SYBR Dye Green I zeigte eine deutlich schlechtere Sensitivität, weshalb ein Verfahren gesucht wurde, mit dem auf die Primer P_K und P_{Ki} zurückgegriffen werden konnte.

Eine Möglichkeit wäre die Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Primers und einer

nahe daneben liegenden Sonde, was sich aufgrund einer unpassenden Sequenz nicht verwirklichen ließ.

Die Messung der Fluoreszenz bei Verwendung von FRET-Hybridisierungs sonden erfolgt während der Phase des Annealings.

2.7.2.3 Molecular Beacons

Molecular Beacons bestehen aus einem Oligonukleotid mit einem Fluorophor (hier: Fluorescein), dem Reporter, und einem nicht fluoreszierenden Quencher (DABCYL®, s. Tabelle 22: Beacon). Freie Beacons bilden aufgrund ihres Aufbaus eine Sekundärstruktur in Stem-Loop Form aus und bringen so Reporter und Quencher in entsprechende räumliche Nähe, was zu einem Erlöschen der Fluoreszenz führt. Das Binden des Beacons an den komplementären Bereich im gesuchten Template trennt Reporter und Quencher, worauf ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Der Beacon wurde mit DNA-Mfold (Zuker 2003 und SantaLucia 1998) überprüft (s. Abbildung 10: Ergebnisse der Sekundärstrukturuntersuchung mit DNA-Mfold). Ein kompatibler Sequenzbereich für den Beacon konnte im PCR-Produkt der Primer Pk und Pki gefunden werden. Beacons zeigen einen hervorragenden Signal-Rausch-Abstand, sind aber auf Basen-Fehlpaarungen sehr empfindlich und werden deshalb hauptsächlich für die Single-Nukleotid-Polymorphism (SNP) Analytik verwendet. Da aufgrund des vorgegebenen Templates immer die selbe definierte Sequenz detektiert wird, spielt die Anfälligkeit auf Fehlpaarungen keine Rolle. Der Zeitpunkt an dem die größte Menge an Beacon am gesuchten Template gebunden ist, ist am Ende des Annealings. Dies ist auch der beste Messzeitpunkt (s. Abbildung 11: PCR-Verlauf und Messzeitpunkt).

Tabelle 22: Beacon

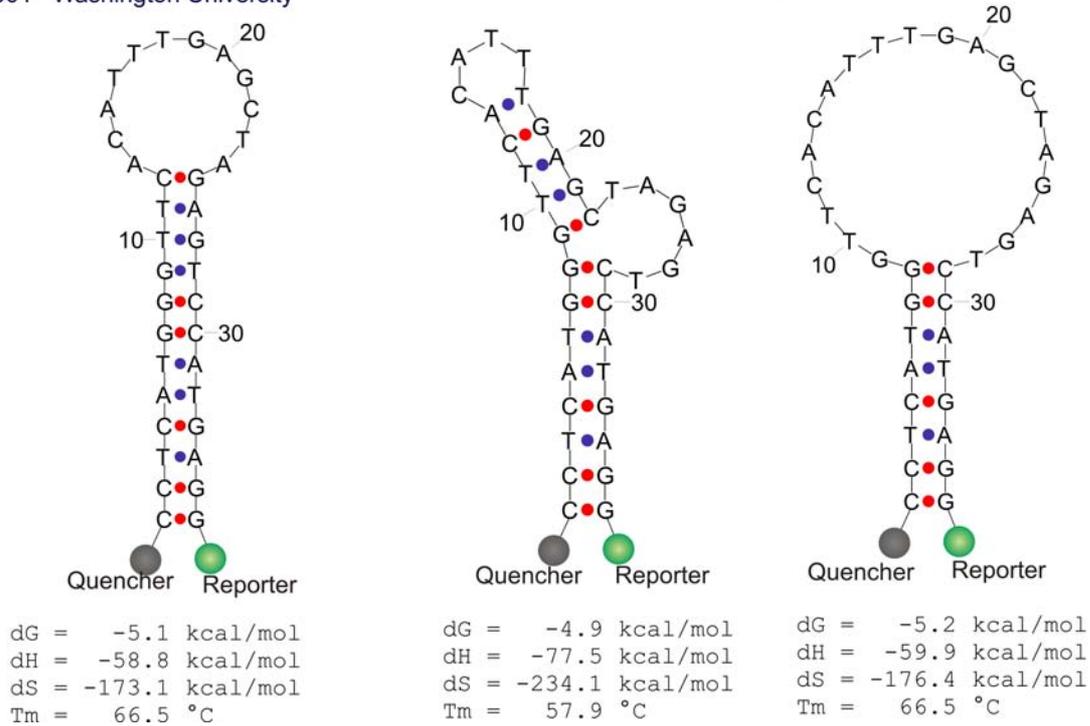
Sequenz des an das PCR-Produkt bindenden Bereichs in Fettschrift; Schmelztemperatur nur des bindenden Bereichs.

Oligonukleotid	5'	3'	T _m [°C]
Pertbeacon2683	(FAM) -CCT CAT ggg TTC ACA TTT gAg CTA gAg	TCC ATg Agg- (DABCYL)	76,1

Abbildung 10: Ergebnisse der Sekundärstrukturuntersuchung mit DNA-Mfold

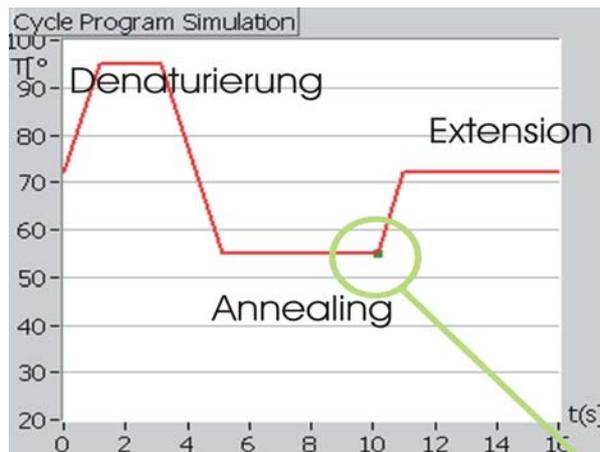
DNA mfold by D. Stewart and M. Zuker
© 2001 Washington University

Linear DNA folding at 55°C Na⁺ 0.3 M Mg²⁺ 0.006 M



Rote und blaue Punkte zwischen den Sequenzsträngen zeigen die in die thermodynamische Berechnung eingeflossenen Wechselwirkungen an. Auch Basenfehlpaarungen fließen in die thermodynamische Berechnung ein.

Abbildung 11: PCR-Verlauf und Messzeitpunkt



Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung

2.8 Sequenzierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mittels Dye-Di-Deoxy-Terminator-Cycle-Sequencing nach Standard-Protokoll sequenziert. Elektrophorese und Detektion der Fragmente erfolgte auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer. Sequenzen wurden mit der Sequence Navigator Software ausgewertet.

2.9 Berechnung von Sensitivität und Spezifität

Zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die folgenden Standardformeln benutzt (s. z.B. <http://de.wikipedia.org>)

Sensitivität:

$$P(\text{positiv erkannt} | \text{tatsächlich positiv}) = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

Spezifität:

$$P(\text{negativ erkannt} | \text{tatsächlich negativ}) = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch positiven}}$$

Konfidenzintervall für Wahrscheinlichkeiten:

Berechnung des Konfidenzintervalls erfolgte für die Wahrscheinlichkeit P über die Bestimmung der Nullstellen folgender Gleichung:

$$g(x) = (n + \lambda_y^2) * x^2 - (2k + \lambda_y^2) * x + \frac{k^2}{n}$$

wobei die relative Häufigkeit als $\tilde{P} = \frac{k}{n}$ definiert wird und

λ_y als das $\frac{1+\gamma}{2}$ -Quantil aus der Standardnormalverteilung.

(aus Wörle 1994)

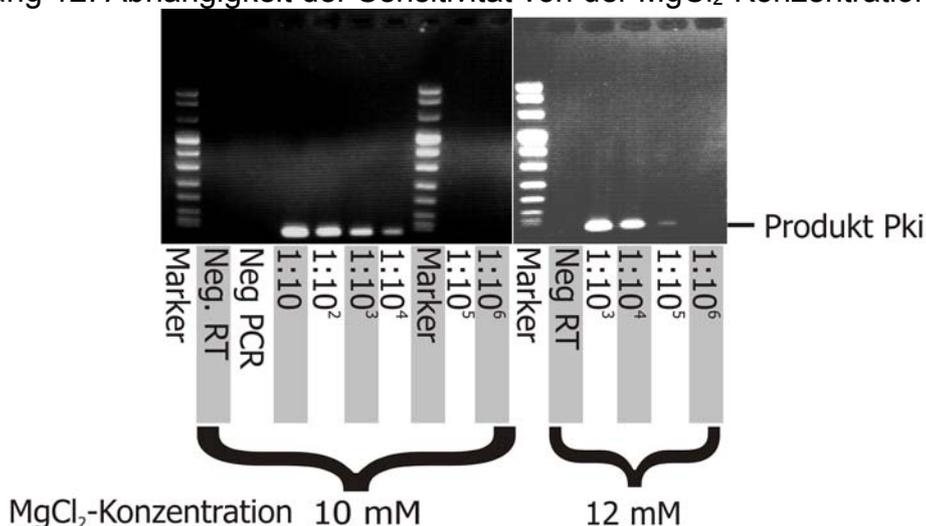
3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der RT-Reaktion

3.1.1 MgCl₂ Konzentration

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Effektivität der RT-Reaktion von der zugegebenen MgCl₂-Konzentration (s. Abbildung 12). Auf den mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen sind die PCR-Produkte für MgCl₂-Konzentrationen von 10 mM und 12 mM im RT-Schritt zu sehen. Als Quelle für die RT wurde Zellkulturüberstand des HIV-Isolates MvP-899 verwendet. Die Ausgangskonzentration des Zellkulturüberstandes lag bei ca. 10⁸ Viruspartikeln/ml. Dies entspricht bei unverdünntem Einsatz in den RT-Test einer Virusmenge von ca. 4 x 10⁶ Partikeln im Reaktionsansatz (In 100 µl Lysat befanden sich 7 x 10⁶ Partikel, davon wurden 60 µl in den RT-Test eingesetzt). Eine Vorverdünnung von 1:10⁵ (entsprechend 10³ Viruspartikeln/ml) führt somit zu einem Probeneinsatz von ca. 40 Viruspartikeln pro Ansatz. Im Bereich von 10-12 mM zeigte sich die optimale Konzentration für den RT-Schritt. So ist bei 10 mM MgCl₂ bei der Verdünnungsstufe 1:10⁴ und bei 12 mM MgCl₂ Einsatz sogar noch bei einer Verdünnungsstufe von 1:10⁵ ein PCR-Produkt zu sehen. Bei niedrigeren MgCl₂-Konzentrationen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der nachweisbaren RT-Aktivität.

Abbildung 12: Abhängigkeit der Sensitivität von der MgCl₂-Konzentration



1:x Verdünnungsstufen von Zellkulturüberstand MVP-899

Neg RT: Negativkontrolle RT-Schritt

Neg PCR: Negativkontrolle PCR-Schritt (nur RT-Puffer als Einsaat)

3.1.2 Optimierung der RT-Primer-Sequenz

Mit dem Primer Rt3529 und der Primer-Kombination PI/Pli wurde ein PCR-Produkt mit falscher Höhe im Ethidiumbromid-Gel detektiert. Statt der erwarteten Bande eines Produktes mit 277 Basenpaaren (s. Tabelle 19: PCR-Produkte) wurde ein Produkt mit 125 Basenpaaren Länge gefunden (s. Abbildung 13). Um die Ursache dieses falschen PCR-Produktes zu klären, wurde dieses Produkt sequenziert. Nach erneutem Vergleich der Primer-Sequenz mit der Template-Sequenz und den Daten aus der Sequenzierung von PI* zeigte sich eine zum Produkt passende Bindungsstelle an der ein Mispriming stattgefunden hat. In Abbildung 14 und Abbildung 15 ist jeweils oben ein Fragment der Sequenz von MS-2 und darunter die Sequenz des Primers Rt3529 (als reverses Komplement) gezeigt. In der mittleren Zeile bedeutet jeweils ein Doppelpunkt eine Übereinstimmung zwischen den beiden Sequenzen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms „matcher“ aus dem EMBOSS-Paket durchgeführt (EMBOSS-Paket: Rice 2000).

Aus diesen Ergebnissen kann auf ein Mispriming im RT-Schritt geschlossen werden. Für ein Mispriming im PCR-Schritt wären zu viele Fehlpaarungen zwischen Template und Primer vorhanden, um bei einer Annealing-Temperatur von 55°C noch zu einer ausreichenden Bindung zu führen. Für ein Priming im RT-Schritt ist bei einer Reaktionstemperatur von 37°C offensichtlich das am 3'-Ende gelegene komplementäre Hexamer ausreichend.

Alternativ wurde der Primer Prt3543 verwendet der kein Mispriming bei 37° C im RT-Schritt zeigte. In Abbildung 16; ist die erwartete Größe der PCR-Produkte zu sehen (vgl. Tabelle 19: PCR-Produkte , Seite 35).

Abbildung 13: Falsche Größe des PCR-Produktes PI mit Rt3529

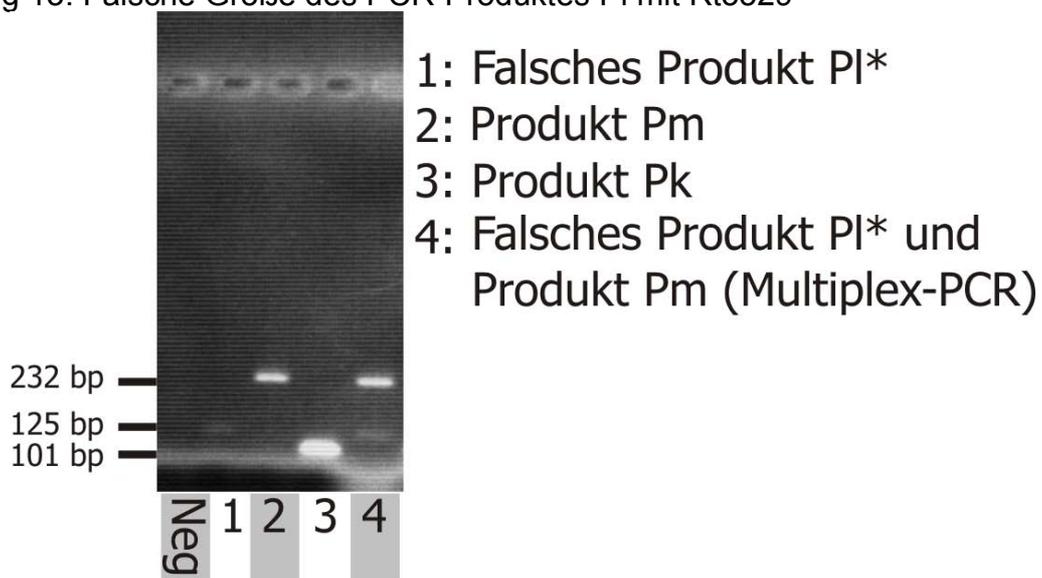


Abbildung 14: Bindung des RT-Primers Rt3529 an geplanter Stelle

```

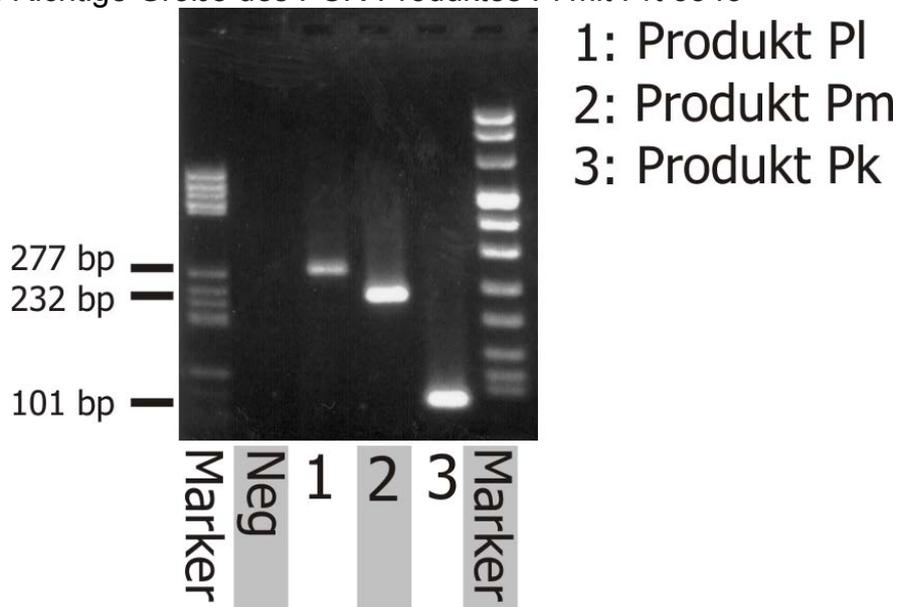
          3530      3540      3550
LEMS2X   CTCCCGATTGTTGTAAGCTG
          .....
RT3529rc CTCCCGATTGTTGTAAGCTG
          10      20
    
```

Abbildung 15: Bindung des RT-Primers an zusätzlicher Stelle

```

          250      260
LEMS2X   CTCCCGGTCGTTTTAACTCGACT
          ..... : : ..... :
RT3529rc CTCCCGATT-TGGTAACTAGCTG
          10
    
```

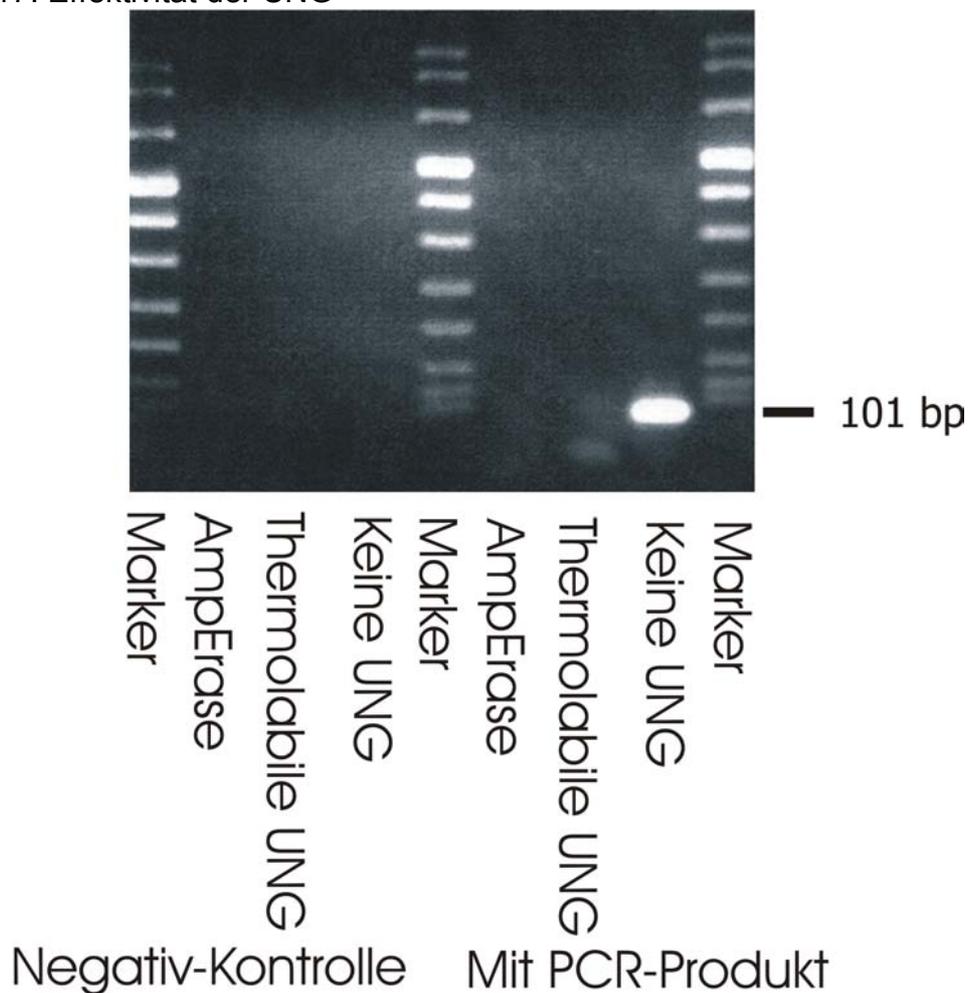
Abbildung 16: Richtige Größe des PCR-Produktes PI mit Prt 3543



3.2 Dekontaminationsstrategie mit UNG

Um die Belastbarkeit der Dekontamination mittels UNG zu demonstrieren, wurde je 1 μ l positives und negatives PCR-Produkt (Pk) aus einem vorhergehenden Test direkt nochmals in die PCR eingesetzt, unter Beibehaltung der Ionenkonzentration. In der Kontrolle ohne UNG zeigte sich das PCR-Produkt wieder auf der richtigen Höhe (s. Abbildung 17). Bei Zugabe von UNG (sowohl thermostabil als auch thermolabil) konnte mittels des Ethidiumbromid-gefärbten Gels kein PCR-Produkt mehr nachgewiesen werden.

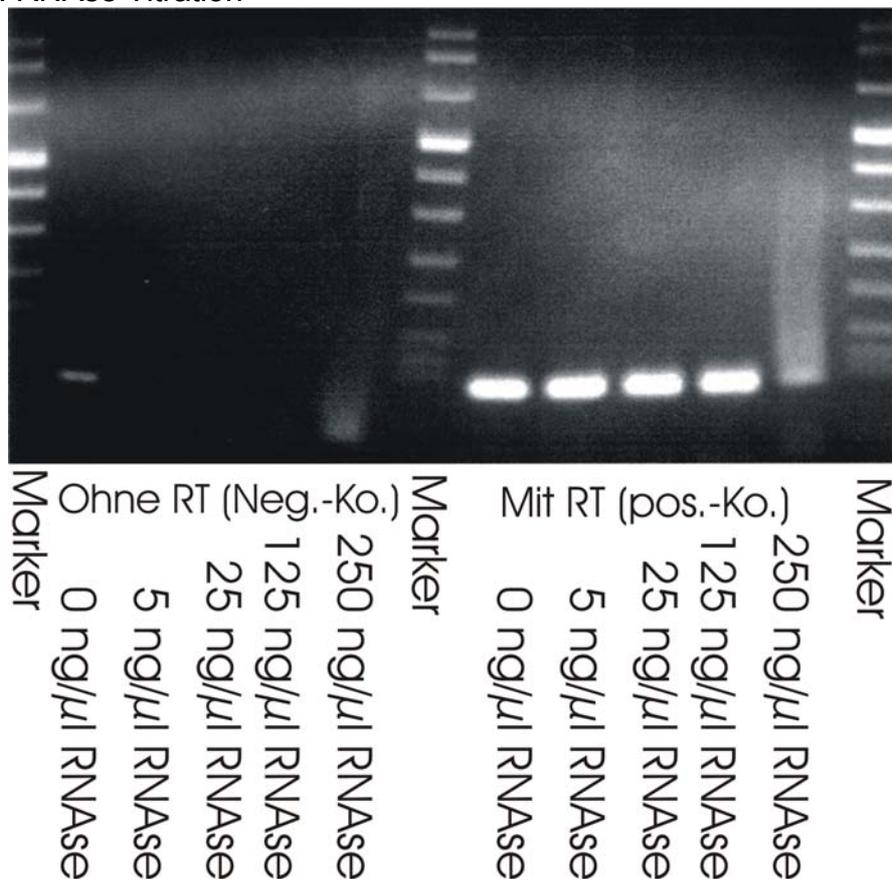
Abbildung 17: Effektivität der UNG



3.3 Effektivität der Entfernung überschüssiger Template-RNA

Eine wichtige Rolle spielt die Entfernung, bzw. ausreichende Degradierung überschüssiger Template-RNA, die von der RT-Reaktion in die folgende PCR-Reaktion verschleppt wird. Hierzu wurde DNase-freie RNase verwendet. Es zeigte sich, dass eine Menge von 5 ng/ μ l RNase ausreichend ist, um überschüssige RNA zu entfernen. Die Versuche wurden mit einer MgCl₂-Konzentration von 13 mM durchgeführt, da sich hier das Aktivitätsmaximum der RT-Aktivität der verwendeten Taq-Polymerase zeigte. Eine geringe intrinsische RT-Aktivität der Taq-Polymerase zeigt sich durch ein nachweisbares PCR-Produkt in der RT-negativen Probe ohne Zusatz von RNase.

Abbildung 18: RNase Titration



3.4 Optimierung der PCR-Reaktion

Die PCR-Reaktion wurde bezüglich der üblichen Parameter optimiert, wie Annealingtemperatur, $MgCl_2$ -Konzentration, Primer und bei den entsprechenden Verfahren hinsichtlich der Konzentration der Fluoreszenzsonde. Die Ergebnisse der Optimierung sind in den bereits im Methodenteil gezeigten Protokollen zu ersehen. Als Beispiel soll die Optimierung des Probeneinsatzes und der $MgCl_2$ -Konzentration gezeigt werden, die aufgrund von Verschleppung aus dem RT-Ansatz gekoppelt sind.

3.4.1 Optimierung des Probeneinsatzes in die PCR-Reaktion und der Magnesiumkonzentration in der PCR-Reaktion

Bei Benutzung des FastStart DNA-Master Hybridization Probes-Mix (s. 2.5.3 HotStart Methode) hat sich eine $MgCl_2$ -Konzentration von 5-7 mM als optimale Menge erwiesen. Der Probeneinsatz konnte auf 10 μ l pro PCR-Reaktion erhöht werden bei einem Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes in der PCR von 20 μ l. In Abbildung 19 werden die Fluoreszenzverläufe während der PCR gezeigt. In Abbildung 20 werden diese Werte in einem Diagramm graphisch aufgearbeitet. Auf der y-Achse ist die Signalstärke bei unterschiedlicher eingesetzter RT-Menge (z-Achse) und der entsprechenden Probenserie (x-Achse) aufgetragen. Die höchste Signalstärke zeigt sich bei einer Magnesiumkonzentration von 5-7 mM und einem Probeneinsatz von 8 bis 10 μ l in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 μ l.

Abbildung 19: Optimierung FastStart-Protokoll mit Beacon (Fluoreszenz)

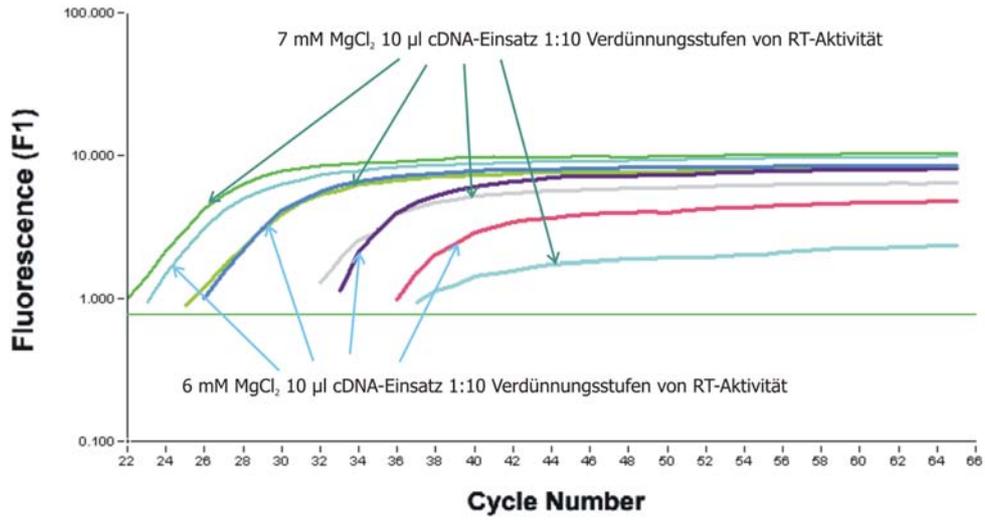
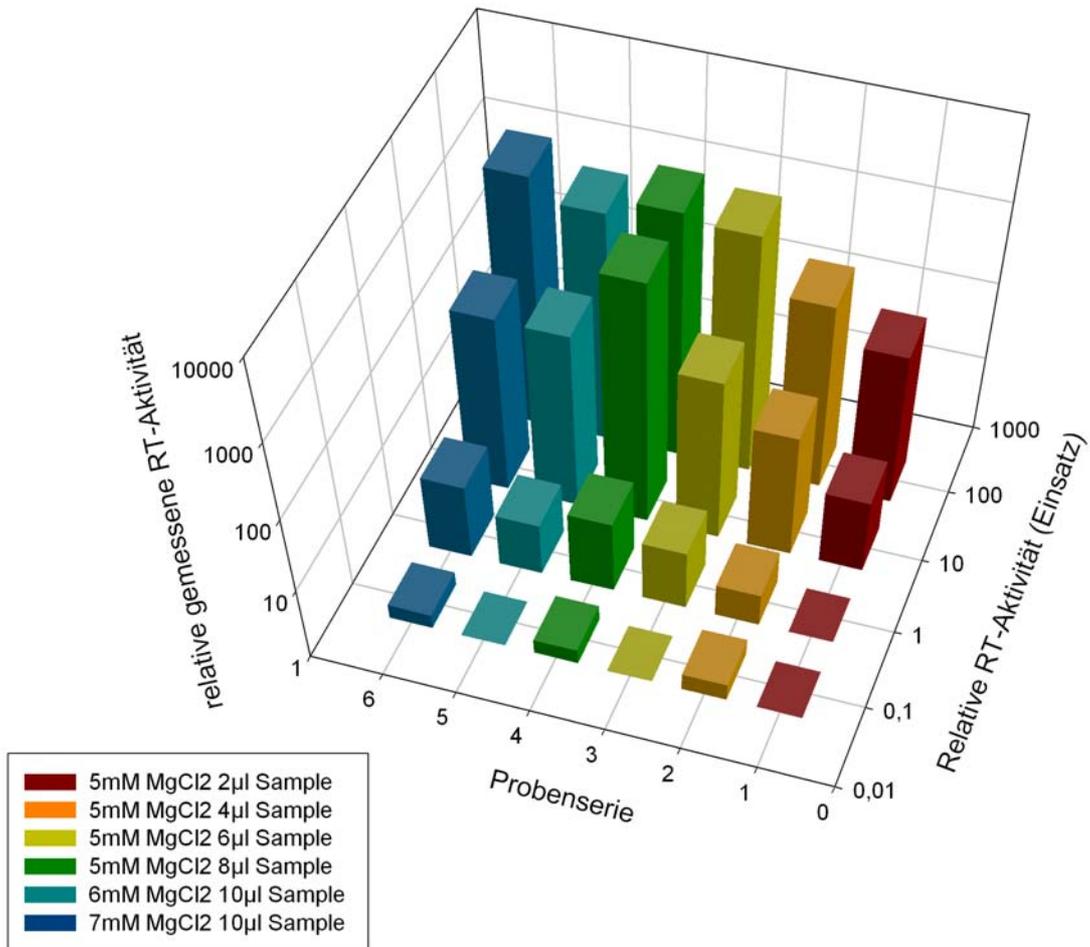


Abbildung 20: Optimierung FastStart-Protokoll Magnesiumchlorid Werte

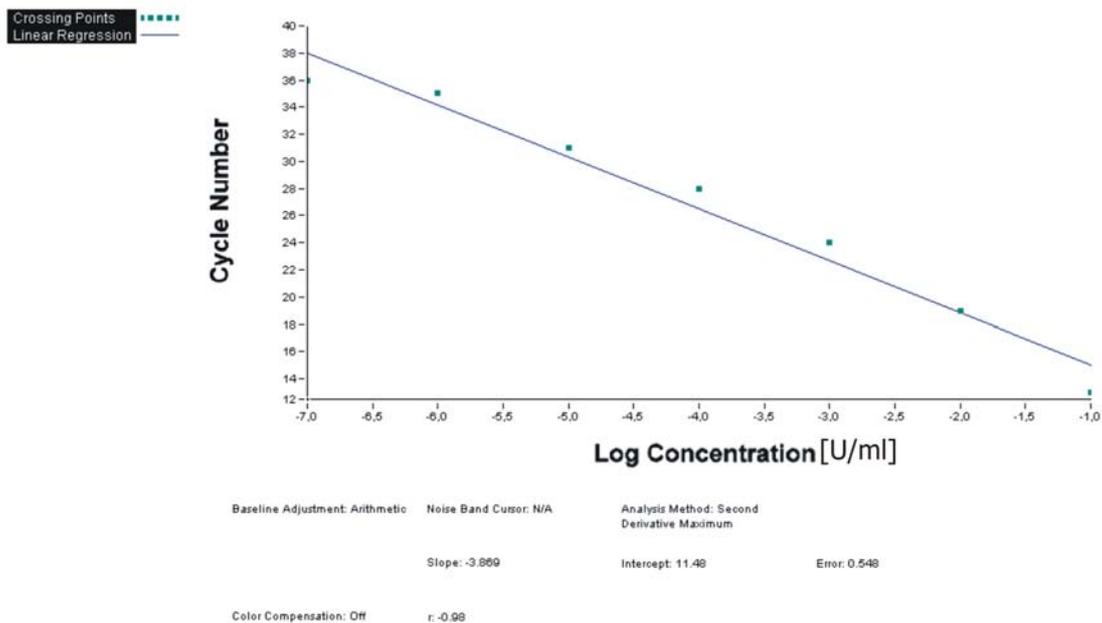


3.5 Sensitivitätsgrenzen

3.5.1 Synthetische RT

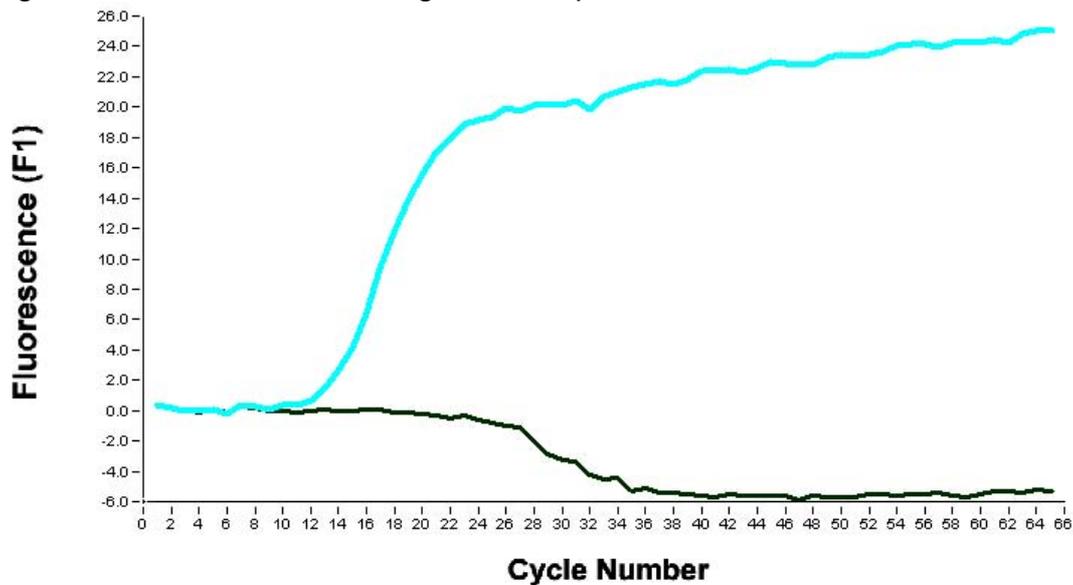
Rekombinant exprimierte RT von HIV-1 wurde in 10er Verdünnungsstufen von 10^{-1} U/ml bis 10^{-7} U/ml verdünnt. 1 Unit ist definiert als die Menge RT, die 1nmol dNTPs bei 37°C in 10 Minuten polymerisiert. Bei einem Probeneinsatz von 20 µl der Verdünnungen in den RT-Assay entspricht dies 2×10^{-3} U bis 2×10^{-9} U/Reaktion. Bei der geringsten Verdünnungsstufe konnte bei einem Cycle-Threshold von 36 noch PCR-Produkt mittels Beacon detektiert werden. In den negativen Kontrollen kam es zu keiner Zunahme von Fluoreszenz im Verlauf der PCR (s. Abbildung 21 und Abbildung 22). Zur Sensitivität und Spezifität siehe auch 3.6.2. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurden einmalig im Triplikat und und in 2 weiteren Testläufen in Einfachbestimmung getestet.

Abbildung 21: Sensitivität Beacon



Aufgetragen ist die Abhängigkeit der CT-Werte von der eingesetzten RT-Aktivität in U/ml

Abbildung 22: Sensitivität Beacon negative und positive Kontrolle



Positiv-Kontrolle türkis, Negativ-Kontrolle schwarz

3.5.2 Nachweis von RT-Aktivität in Plasma

3.5.2.1 Grenzen der Plasma-Einsatzmenge

Die maximale Menge des Probeneinsatzes wird durch die Proteinkonzentration beschränkt. Eine sinnvolle Abarbeitung war nur möglich bei Einsatz von maximal 2 µl Plasma auf einen 90 µl RT-Ansatz, da es bei größerer Eiweißkonzentration zu einem kompletten Gelieren des RT-Reaktionsansatzes kam. Bei einer Probeneinsatzmenge von 2 µl war bereits eine Präzipitation von denaturiertem Protein sichtbar.

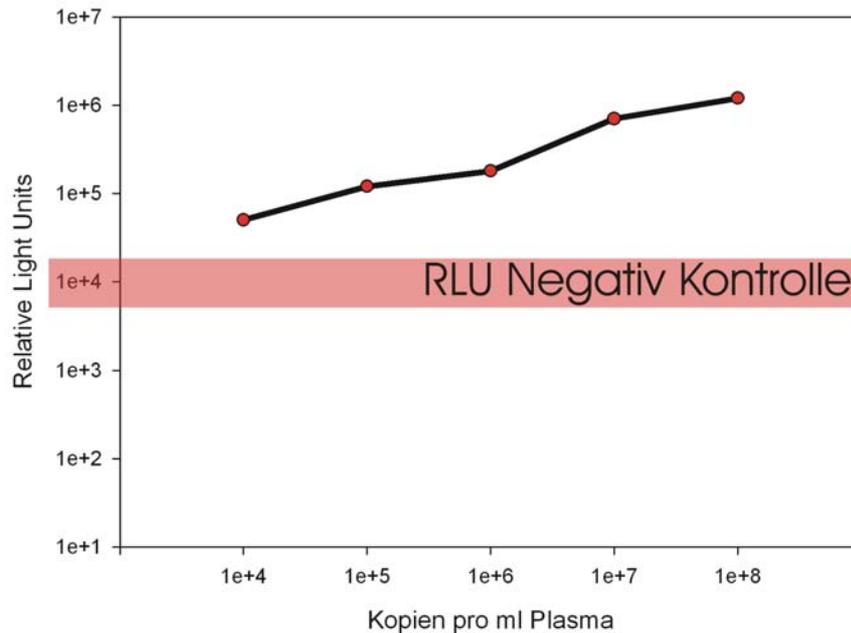
3.5.2.2 Nachweisgrenze in Plasma

Um die Abhängigkeit der RT-Aktivität von Störeinflüssen zu beurteilen wurden 2 µl Plasma mit unterschiedlicher Viruskonzentration in den RT-Assay eingesetzt. Hierzu wurde von HIV-negativen Blutspendern Plasma mit Virus (MVP-899) aus der Zellkultur versetzt. Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgte mittels Endpunktbestimmung. Da kein zusätzlicher Quantifizierungsstandard benutzt wurde, wird der Rohwert der Chemolumineszenzmessung in RLU (Relative Light Unit) angegeben.

Anfangen von einer Viruskonzentration entsprechend 10^8 Viruspartikeln/ml wurde in 10er Verdünnungsstufen in negativem Plasma weiter verdünnt. In der Endpunktmessung konnte bis zu einer Konzentration, die 10^4 Viruspartikeln/ml entsprach, im eingesetzten

Plasma eine Chemolumineszenzaktivität über dem Grundrauschen detektiert werden. Dies bedeutet einen tatsächlichen Einsatz einer RT-Menge von 20 Viruspartikeln in die Reaktion bei 10^4 Viruspartikeln/ml im Plasma.

Abbildung 23: Nachweis von RT-Aktivität in Plasma



3.5.2.3 Nachweis von RT-Aktivität in Patientenproben

Insgesamt wurden 12 Proben mit Viruslasten im Bereich von weniger als 50 Kopien/ml (Nachweisgrenze) und bis zu 120.000 Kopien/ml untersucht. Bei keiner Probe konnte eine RT-Aktivität nachgewiesen werden. Es wurde, wie im vorhergehenden Versuch, eine 2 μ l Plasmaprobe in den Test eingesetzt.

3.6 Spezifität und Störfaktoren

3.6.1 Spezifität und Sensitivität bei Verwendung von Zellkulturüberständen HIV-infizierter Zellen

Mit dem endgültigen Protokoll für Zellkulturüberstände wurden im Verlauf weiterer Testungen insgesamt 32 Überstände von nicht infizierten H9-Zellen und 74 vorverdünnte Überstände von infizierten H9-Zellen oder PBMCs getestet. Aus den in der Tabelle 23 zusammengefassten Ergebnissen kann mit den unter 2.9 genannten Formeln eine Sensitivität von 100% (95%-Konfidenzintervall von 95%-100%) und eine Spezifität von 100% (95%-Konfidenzintervall von 89%-100%) errechnet werden.

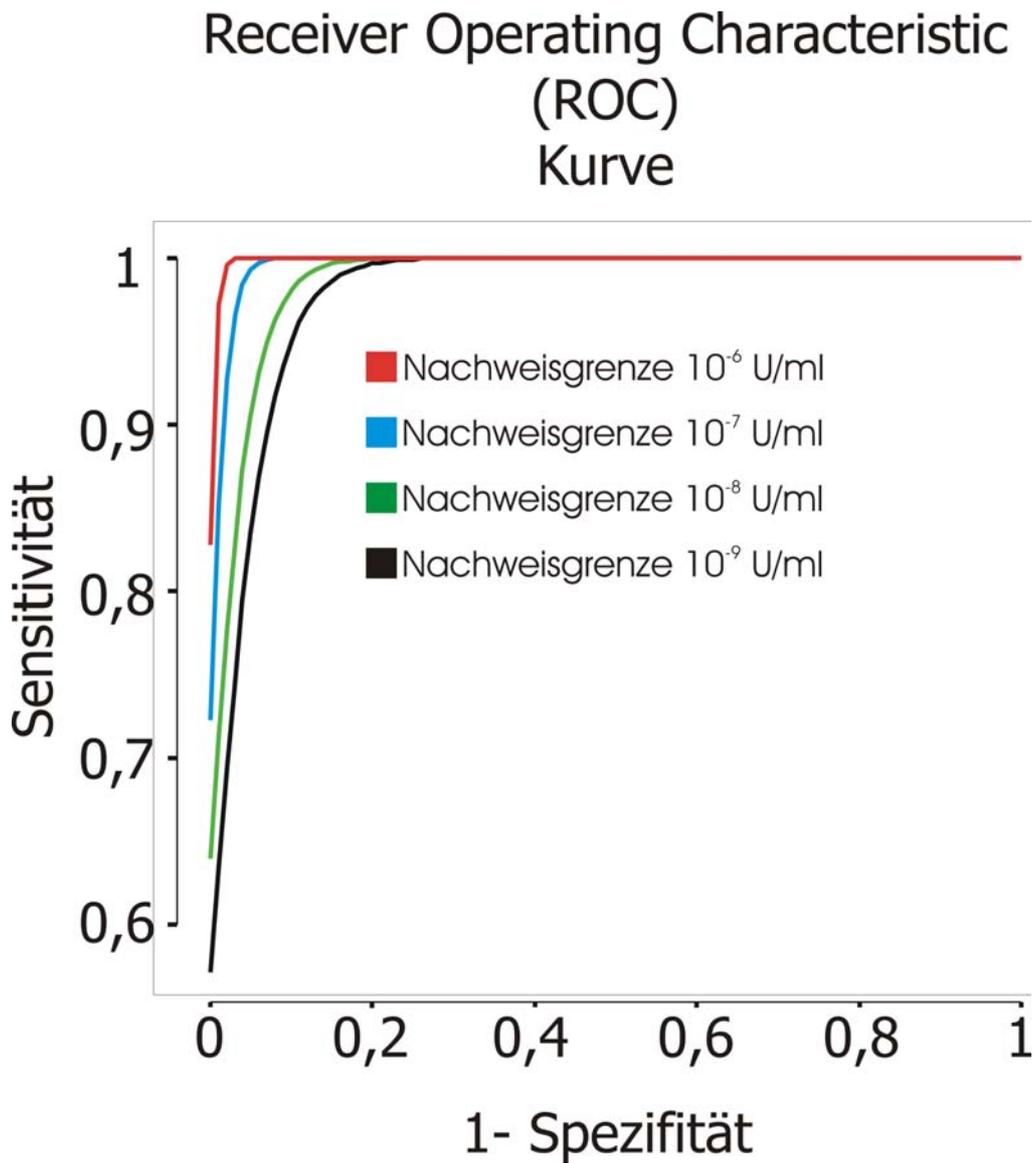
Tabelle 23: Vierfelder-Tafel zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität von Zellkulturüberständen

	Überstand infizierter Zellen	Überstand nicht infizierter Zellen	Summe
Testergebnis positiv	74	0	74
Testergebnis negativ	0	32	32
Summe	74	32	106

3.6.2 Spezifität und Sensitivität bei Verwendung rekombinanter RT

Die Ergebnisse des unter 3.5.1 genannten Versuchs zur Bestimmung der Nachweisgrenze kann auch in qualitativer Weise ausgewertet werden. Hierzu wurden nach Baseline-Korrektur in der LightCycler-Software die erhaltenen korrigierten Fluoreszenz-Werte in OpenOffice.org Calc importiert. Als qualitativ positives Ergebnis wurde das Erreichen eines Fluoreszenz-Tresholdes definiert. Aus diesen Daten wurde in Abhängigkeit von der angestrebten Nachweisgrenze Sensitivität und Spezifität errechnet. Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurden in der erhaltenen Receiver-Operating-Characteristic (ROC) Kurve nur die Regressionskurven bei unterschiedlicher angestrebter Nachweisgrenze dargestellt (s. Abbildung 24). ROC-Kurven bzw. deren Regressionskurven wurden mit R erstellt (<http://cran.r-project.org>).

Abbildung 24: ROC-Kurven des Nachweises synthetischer RT

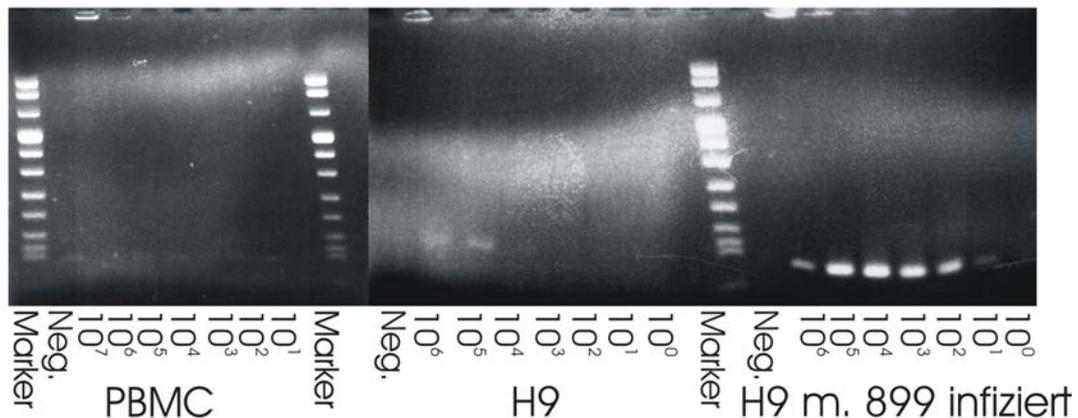


3.6.3 Störfaktoren

Zur Bestimmung der Störanfälligkeit gegenüber zellulären Polymerasen wurden verschiedene Zellpräparationen miteinander verglichen. In den frischen Spender-PBMCs, per Ficoll®-Gradient aus Citrat-Blut aufgereinigt, zeigte sich kein Hinweis auf RT-Aktivität. Im Unterschied dazu zeigte sich bei nicht infizierten H9-Zellen ab 10^5 eingesetzten Zellen auf dem Gel ein PCR-Produkt. Hier kann spekuliert werden, ob es sich um ein ähnliches Phä-

nomen handelt, wie bei der intrinsischen RT-Aktivität der Taq-Polymerase, oder ob es sich hier um eine tatsächliche, geringe RT-Aktivität bei der immortalisierten Zelllinie handelt. Bei H9-Zellen, die mit dem HIV-Stamm MvP-899 infiziert waren, konnte bis zur Menge von 10 Zellen im Reaktionsansatz RT-Aktivität nachgewiesen werden.

Abbildung 25: RT-Aktivität in verschiedenen Zell-Präparationen



3.7 Beispiel für den Nachweis von Resistenz gegen AZT und 3TC

Eine möglicher Einsatz eines hochsensitiven RT-Assays ist die Überprüfung der Suszeptibilität der RT auf verschiedene Inhibitoren.

Im folgenden wurde die RT-Aktivität des empfindlichen Subtyp B Stammes MvP-899 mit dem resistenten Stamm MvP-08801-99 (s. Tabelle 5, S. 23) unter verschiedenen Konzentration von Inhibitoren getestet. Als Inhibitoren standen uns die aktiven Metabolite von AZT (aktiver Metabolit: AZT-TP) und 3TC (aktiver Metabolit: 3TC-TP) zur Verfügung. In den beiden folgenden Abbildungen (Abbildung 26 und Abbildung 27) wird jeweils die RT-Aktivität bei einer bestimmten Inhibitor-Konzentration mit der RT-Aktivität ohne Zusatz von Inhibitor verglichen. Vor allem bei AZT kann der Unterschied der inhibierenden Konzentrationen zwischen resistentem und sensiblem Stamm sichtbar festgestellt werden. Die Resistenz scheint bei 3TC deutlich geringer ausgeprägt, was bei fehlender Schlüsselmutation für 3TC (M184V) nicht verwunderlich ist. Die häufig benutzten Algorithmen (s. Tabelle 7, S. 24) gehen bei dem Mutationsmuster dieses Stammes von einer eher geringgradigen Lamivudinresistenz aus.

Abbildung 26: Inhibition durch 3TC-TP

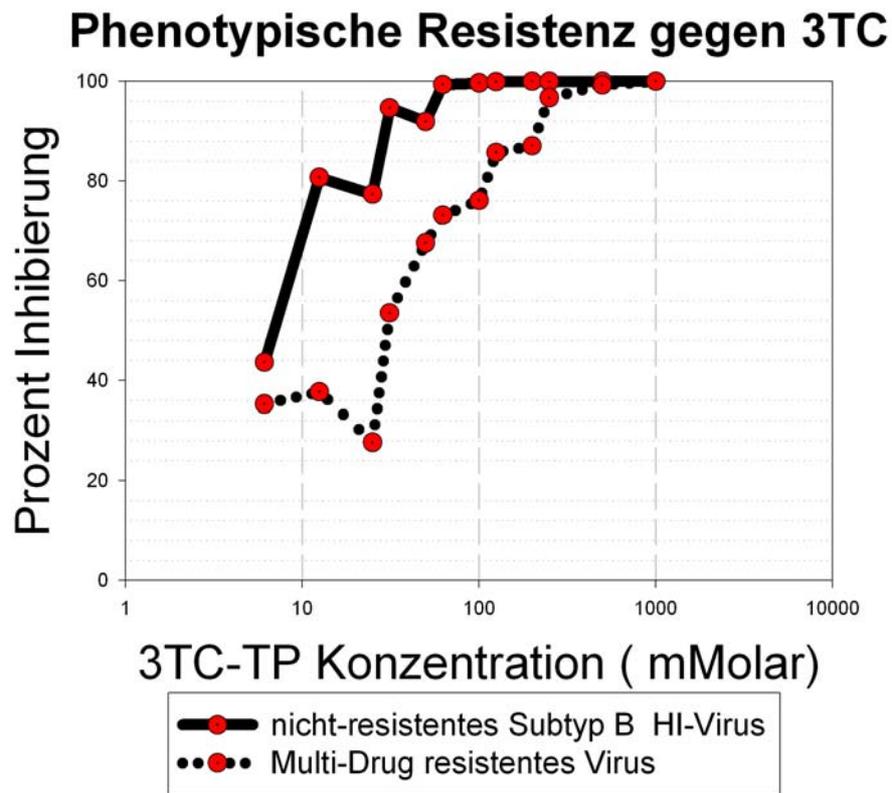
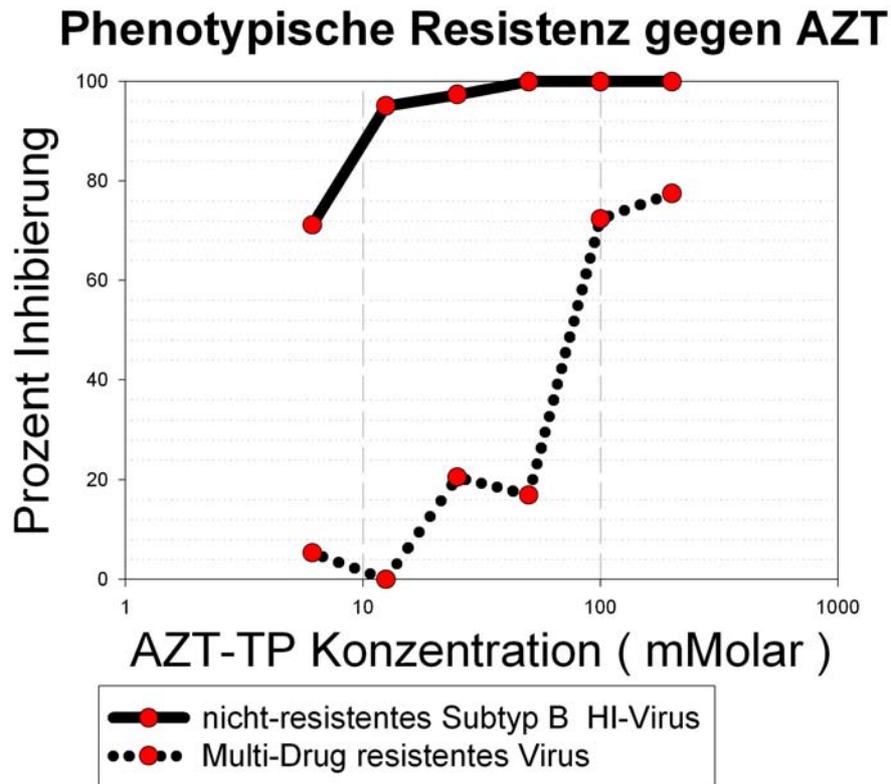


Abbildung 27: Inhibition durch AZT-TP



3.8 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Alle hier genannten Resultate stellen die Endpunkte zahlreicher Vorexperimente dar. Alle Versuche wurden zur Bestätigung des Ergebnisses mindestens einmal wiederholt. Einzelne Versuche (z.B. unter 3.5.1 genannte Versuche zur Bestimmung der Nachweisgrenze von synthetischer RT) wurden in Triplikaten durchgeführt und speziell der Versuche von 3.5.1 wurden auf zwei darauf folgenden Tagen im Einfachansatz wiederholt.

4 Diskussion

4.1 Optimierung des Verfahrens

Die Optimierung dieses quantitativen Verfahrens zeigte einige wichtige Punkte in Bezug auf den Nachweis von RT und auf die Real-Time-Quantifizierung auf. Die Optimierung in Bezug auf Kontaminationssicherheit durch UNG und dUTP ließ sich sehr gut in das System integrieren.

4.1.1 Bindung des RT-Primers

Die Optimierung des RT-Primers stellt eine besondere Schwierigkeit dar, wenn, wie in diesem Fall, eine definierte Länge der generierten cDNA benötigt wird. Bei Reaktionstemperaturen von 37°C kann eine Hybridisierungsstrecke von nur sechs Nukleotiden für ein Priming ausreichend sein. Ein Mispriming mit nur sechs Nukleotiden wird offensichtlich durch typische Standardeinstellungen der Primer-Design-Software nicht berücksichtigt.

Aufgrund eines Misprimings im RT-Schritt kam es statt des erwarteten Produkts PI mit einer Länge von 277 Basenpaaren zu einem Produkt PI* von 125 Basenpaaren. Dieses Mispriming ist vor allem bei der Amplifikation des Produktes PI störend, bei der es aufgrund eines gemeinsamen Primers hoch-kompetitiv wirkt.

Es kann aber auch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass ein Mispriming vor den anderen PCR-Produkten auftritt. Es könnte zum Beispiel ein Mispriming im RT-Schritt kurz vor dem 1. PCR-Produkt auftreten, wobei es sich dann nicht um 1.000 Basen Schreiblänge bis zu diesem PCR-Produkt handeln würde. Ein Primer der zum Beispiel 200 Basen vor dem 1. PCR-Produkt binden würde, würde an der Größe des PCR-Produktes nichts verändern. Die falsche Größe des PCR-Produktes war im beobachteten Fall aber bei den Produkten PI und PI* der einzige Hinweis auf ein Mispriming.

Ein Ausschluss von weiterem RT-Mispriming würde sich äußerst zeitaufwändig und kompliziert gestalten. Es müssten in geringen Abständen einzelne, kurze, überlappende PCR-Produkte über den gesamten revers transkribierten Bereich generiert werden, um wieder eine Konstellation zu erreichen in der ein PCR-Produkt mit falscher Größe entsteht.

Für die alleinige Aktivitätsmessung über das PCR-Produkt Pk sollte das Problem des Misprimings keine Rolle spielen, wenn, wie im hier gewählten Format, immer ein externer Quantifizierungsstandard mitgeführt wird. Untersuchungen der Kinetik der RT über die komplette Länge durch Quantifizierung von Pm und PI könnten durch diesen Effekt aber

durchaus beeinträchtigt werden.

4.1.2 Intrinsische RT-Aktivität der Taq-Polymerase

Zu einem wichtigen Einflussfaktor auf die RT-Aktivitätsmessung kann die intrinsische RT-Aktivität der Taq-Polymerase werden. Diese erscheint zwar gering, würde aber bei Inhibition der RNase oder fehlender RNase zu falsch positiven Ergebnissen führen. Da hochsensitive RT-Tests mit Amplifikationsschritt z.B. in der Untersuchung von Lebensmitteln und Impfstoffen auch qualitativ verwendet werden, wären falsch positive Ergebnisse sehr störend. Die RT-Aktivität ist dabei nicht auf spezielle Enzyme für Single-Tube-RT-PCR-Verfahren beschränkt, auch „Standard“-Polymerasen wie AmpliTaq-Gold weisen diese RT-Aktivität auf. Ein Single-Tube-Verfahren würde analog zu den RT-PCRs zum Nachweis von RNA-Genomen die Kontaminationssicherheit noch weiter erhöhen und den Arbeitsaufwand während des Tests erniedrigen, da ein Pipettierschritt entfällt. Da aber aufgrund der intrinsischen RT-Aktivität der thermostabilen Polymerasen eine Zugabe von RNase erfolgen muss und diese aber nicht vor der RT hinzugefügt werden kann, schließt dies ein einfaches Single-Tube-Verfahren aus. Ein Single-Tube Verfahren wurde aber trotz dieser Einschränkung beschrieben (Arnold 1998). Im Unterschied zu dem hier beschriebenen Verfahren wurde eine niedrigere Konzentration von 5 mM MgCl₂ verwendet, was eine intrinsische RT-Aktivität möglicherweise reduziert. Trotzdem fällt in der Arbeit von Arnold et al. auf, dass die verwendete negative Puffer-Kontrolle bei durchschnittlich ct 38,35 Fluoreszenzsignale aufweist. Es kann nur vermutet werden, ob es sich um Kontamination oder intrinsische RT-Aktivität der verwendeten AmpliTaq-Gold handelt. Auch wird in diesem Zusammenhang die Kontamination der verwendeten Reagenzien mit MS2-DNA diskutiert. So werden vor allem die Taq-Polymerasen rekombinant in *Escherichia coli* (bakterieller Wirt von MS2) hergestellt und unter bestimmten Bedingungen wäre ein Entstehen von MS2-DNA im Produktionsprozess vorstellbar (Kothapalli 2003).

Eine Möglichkeit trotzdem ein Single-Tube Verfahren anzuwenden wurde von Sears et al. (Sears 2003) gezeigt. Das leider mechanisch nicht sehr leicht durchzuführende Verfahren trennt den RT-Reaktionsansatz von dem PCR-Reaktionsansatz durch ein bei ca. 60°C schmelzendes Wachs. Die RT-Reaktion kann bei 37°C durchgeführt werden und die Vermischung mit dem PCR-Reaktionsansatz erfolgt erst nach Erhitzen über 60°C. Dadurch kann der übliche Ablauf aufrecht erhalten werden mit der Möglichkeit der Verwendung einer RNase zum Verdau überschüssigem RNA-Templates.

4.2 Spezifität

4.2.1 Auswertung der Spezifität

In 3.6.1 und 3.6.2 wurden die üblichen statistischen Methoden zur Beschreibung der Spezifität und Sensitivität eines Verfahrens angewandt. Die Spezifität ist wie bei PCR-Verfahren üblich sehr hoch. Die eingeschränkte Probenzahl beeinflusst aber deutlich das 95%-Konfidenzintervall der Sensitivität und Spezifität. Leider muss die Beschreibung der Spezifität artifiziell bleiben da reproduzierbare Störfaktoren vorhanden sind, deren endgültige Klärung offen steht. So kann aus dem unter 3.6.3 beschriebenen Versuch nicht eindeutig entschieden werden, ob tatsächlich in H9-Zellen richtigerweise geringe Mengen an RT-Aktivität nachgewiesen werden kann, oder ob das Vorhandensein von „echter“ RT-Aktivität durch zelluläre Polymerasen vorgetäuscht wird.

4.2.2 Beeinflussung durch zelluläre Polymerasen

Eine wichtige Einschränkung der Spezifität von PCR-basierten RT-Assays können zelluläre Polymerasen sein. So wurde mittels eines PERT-Assays RT-Aktivität der humanen DNA-Polymerase- η nachgewiesen (Franklin 2004).

Obwohl bei den hier durchgeführten Versuchen keine RT-Aktivität bei Verwendung von PBMCs von gesunden Spendern nachgewiesen worden ist, kann ein Einfluss von zellulären DNA-Polymerasen im Falle der Lymphomzelllinie H9 nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur ist als möglicher Ansatz für dieses Problem das Hinzufügen von synthetischer DNA beschrieben (Voisset 2001). Die zugefügte synthetische DNA stellt für die zellulären Polymerasen in Konkurrenz mit MS2-RNA das bessere Substrat dar und verhindert so unspezifische RT-Aktivität. Dieses Verfahren soll die Sensitivität weitgehend nicht beeinflussen.

4.3 Nachweisgrenze

Die absolute Nachweisgrenze von rekombinant hergestellter RT und RT aus Zellkulturüberstand bewegte sich im gleichen gutem Rahmen, wie in den von Pyra (Pyra 1994) und Chang (Chang 1997) beschriebenen Verfahren. So zeigte sich in diesen Proben eine Nachweisgrenze von 10^{-9} U RT-Aktivität bzw. von mindestens 40 Viruspartikeln pro Testansatz. Für diese Art von Proben scheinen die durchgeführten Modifikationen keine große Auswirkung auf die Sensitivität zu haben.

Da PCR basierte Tests untere Nachweisgrenzen in einem Bereich besitzen in dem stochastische Effekte bereits eine deutliche Auswirkung zeigen, erfolgt die Angabe der unteren Nachweisgrenze üblicherweise anhand einer 95% hit rate bei bestimmter Konzentration. Als Beispiel hierfür können die für die CE-Zertifizierung erhobenen Daten des Cobas TaqMan HBV-DNA NAT angeführt werden (Hochberger 2006). Die Bestimmung der 95% hit rate erfolgt üblicherweise mittels einer PROBIT-Analyse. Die PROBIT-Funktion ist die inverse kumulative Verteilungsfunktion der Normalverteilung. Ein PROBIT-Modell ist eine Anwendung eines generalisierten linearen Modells um eine binomiale Verteilung (in diesem Fall Anzahl von positiven vs Anzahl von negativen) auf einen bestimmten Wert (hier die Einsaat-Konzentration) abzubilden. Die zur Datensammlung ausgewählten Konzentrationen sollten dabei sehr nahe an der erwarteten Nachweisgrenze liegen. Zwangsläufig ist die Anzahl der benötigten Replikas für eine valide Aussage relativ hoch. Hochberger et al. testeten für HBV insgesamt 7 Konzentrationen nahe der unteren Nachweisgrenze in jeweils 50 Replikaten. Untersuchungen in dieser Form sind für PERT-Assays bisher nicht beschrieben und wurden, da somit auch harte Vergleichsdaten fehlen und der Aufwand sehr hoch ist, im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt. Falls aber eine ausreichend gute Aufreinigung von reverser Transkriptase, bzw. Viruspartikeln aus Blutplasma zur Verfügung steht (s. 4.4.3 Mögliche Methoden zur Verbesserung), sollte eine PROBIT-Analyse durchgeführt werden. (Definition PROBIT: s. <http://en.wikipedia.org/wiki/Probit> oder <http://cran.r-project.org/>)

4.4 Nachweisgrenze im Blutplasma

Durch die Gruppe um Garcia-Lerma (Garcia-Lerma 1998) wurde bereits gezeigt, das durch Ultrazentrifugation ein Nachweis von RT-Aktivität im Plasma mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 500 Viruspartikeln/ml gelingen kann.

4.4.1 Schlechtere Nachweisgrenze im Blutplasma.

Die absolute Nachweisgrenze für RT-Aktivität im Blutplasma von HIV negativen Patienten, zu dem Virus aus der Zellkultur hinzugefügt wurde bewegt sich auf deutlich schlechterem Niveau, wie in dem von Garcia-Lerma (Garcia-Lerma 1998) beschriebenen Verfahren. Die absolute Menge an Virus im Reaktionsansatz, die noch zu einem detektierbaren Signal führt, ist mit 20 Viruspartikeln sehr gering. Die Einschränkung des Probeneinsatzes auf 2 μ l Plasma hat aber zur Folge, dass die untere Nachweisgrenze nur Äquivalent zu 10^4 Viruspartikeln/ml ist. Dies trifft aber nur auf Plasma von nicht-infizierten und nicht behandel-

ten Patienten zu. Bei den behandelten Patienten konnte, trotz Viruslasten von bis zu 10^5 Kopien/ml, keine RT-Aktivität nachgewiesen werden.

4.4.2 Mögliche Gründe für schlechteren Nachweis

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Protokollen für den direkten Einsatz von Plasma (ohne weiter Aufreinigungs- und oder Zentrifugationsschritte) zeigt der hier beschriebene Test eine mindestens um Faktor 20 schlechtere untere Nachweisgrenze. Der Hauptgrund hierfür dürfte die insgesamt höhere Empfindlichkeit auf Inhibitoren sein. Dieser vermutlich durch die 10mal längere Schreiblänge der RT bedingte Effekt erhöht nicht nur die Empfindlichkeit auf AZT-TP, sondern auch gegen plasmatische Störfaktoren, wie unspezifische Hemmung durch RNA-bindende Proteine oder Antikörper gegen p51 und p66. Ein weiterer Punkt ist sicher die schwierige Kontrolle der Frische der Proben, da Konservierung durch Lagern bei -20°C zu einer Abnahme der RT-Aktivität führt.

4.4.3 Mögliche Methoden zur Verbesserung

4.4.3.1 Anreicherung durch Zentrifugation

Eine standardisierte Anreicherung durch Ultrazentrifugation erscheint schwierig, da diese unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen stattfinden muss und verbleibende Plasmaresse schwer abzuschätzen sind. Dazu kommt das Risiko des Probenverlustes, da nach der Zentrifugation ein nicht sichtbares Pellet im Lysepuffer aufgenommen werden muss. So sieht man auch in den Arbeiten von Garcia-Lerma (Garcia-Lerma 1998), dass trotz der ermittelten unteren Nachweisgrenze von 500 Viruspartikeln/ml einzelne Proben mit höherer Virusmenge (z.B. 6900 Kop. RNA/ml) keine Reaktivität im durchgeführten RT-Test zeigten.

Die bisher beschriebenen Ultrazentrifugationsprotokolle lassen sich auf üblichem Laborequipment im Routinebetrieb nicht nachvollziehen, da hier meist größere Volumen in speziellen und somit teuren Probengefäßen zentrifugiert werden. Diese Gefäße sind für eine mehrmalige Verwendung ausgelegt, was bei ultrasensitiver Messung zu Kontaminationsproblemen führen würde.

Falls das erforderliche Equipment für die Ultrazentrifugation eingesetzt wird, ist dies ein mögliches Verfahren, dessen bedingte Funktionsfähigkeit von anderen Gruppen gezeigt werden konnte.

4.4.3.2 Anreicherung über Affinitätsbindung

Andere Verfahren, um Störfaktoren zu vermindern, versuchen gezielt HI-Viren mit Antikörpern aus dem Plasma zu gewinnen. Dieser Möglichkeit wurde in der Dissertation von Markus Opgen-Rhein nachgegangen (noch nicht publiziert). Durch Benutzung von Anti-HLA2 Antikörpern werden Viren über oberflächlich gebundene HLA-Moleküle an einer festen Phase immobilisiert und können bei konsekutiven Waschschrritten von Inhibitoren befreit werden. Dies ermöglicht nun den Nachweis von RT-Aktivität in Patientenproben, leider scheinen aber Verluste in der Aufreinigung weiterhin einen Nachweis einer RT-Aktivität von weniger als 1000 HI-Viren zu verhindern.

Eine weitere Möglichkeit ist das Binden von Viren an ein anionisches Ionen-Austausch-Medium (Gel). Die Funktionalität für dieses Verfahren konnte bereits demonstriert werden (Greengrass 2005, Malmsten 2003). Die Versuche wurden aber nur mit dem konventionellen RT-Assay der Firma CAVIDI (<http://www.cavidi.se>) durchgeführt. Der komplette Assay wird mittlerweile unter der Bezeichnung ExaVir® Load von dieser Firma vertrieben. Die gesamte Prozedur zur RT-Aktivitätsmessung dauert ca. 3 ½ Tage wovon 1 Tag auf die Aufreinigungsprozedur entfällt.

4.5 Mögliche Anwendungsgebiete

Die potentiellen Anwendungsgebiete des Verfahren sind zahlreich. Ein limitierender Faktor ist aber immer die Nachweisgrenze im Plasma. Erst durch Lösung dieses Problems wird die volle Bandbreite an potentiellen Anwendungsgebieten erreicht.

4.5.1 Kontaminationsüberwachung im Produktionsprozess von Therapeutika

PERT-Assays können zum Screening von Replikations-kompetenz bei retroviralen Vektoren für die Gentherapie verwendet werden (Sastry 2005, Miskin 2006).

Das Screening auf Retroviren im Rahmen der Impfstoff-Produktion mittels PERT entwickelt sich zu einem festen Bestandteil der Freigabe-Kriterien für Infektionssicherheit (Lewis 2006). Falsch positive Ergebnisse durch zelluläre Polymerasen schränken dies jedoch auf Zellkulturüberstände ein und verhindern eine Verwendung bei Zell-Lysaten. Eine endgültige Lösung für dieses Problem scheint derzeit nicht in Sicht (Chang 2006, s. a. 4.2.2 Beeinflussung durch zelluläre Polymerasen)

Auch in der Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAb) kann ein Monitoring mittels PERT sinnvoll sein. So produzieren die verwendeten Zellen (z.B. murine Hybridoma-Zellen), teilweise in hohen Konzentrationen, Typ C Retroviren aus endogenen Retrovirussequenzen. Der Nachweis von RT-Aktivität in den einzelnen Produktionsschritten wurde von Brorson beschrieben (Brorson 2001 und Brorson 2002)

4.5.2 RT-Aktivitätsnachweis bei inkonsistenten HIV-Viruslasten

Ein immer wieder auftretendes Problem ist eine nicht nachweisbare Viruslast bei Patienten mit absinkenden CD4-Zellzahlen. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Dazu gehören von der Viruslastmessung nicht erfasste HIV-Subtypen und Mutationen in den Bereichen der Primer oder Sonden für die quantitative PCR oder die branched-DNA. Diese Mutationen würden aber zu keiner Veränderung in der RT-Aktivität führen, da es sich hier um eine für die Replikation essentielle Funktion des Virus handelt. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis von HIV-1 Subtyp O RT-Aktivität durch Garcia-Lerma (Garcia-Lerma 2000). Mittels der bisher üblichen Verfahren zur Bestimmung der Viruslast (RT-PCR, bDNA) kann bei einer Infektion mit HIV-1 Subtyp O meist überhaupt kein oder im Falle der bDNA nur ein weitaus zu geringer Wert der Viruslast nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür sind Sequenzunterschiede zwischen den HIV-Subtypen. Diese Sequenzunterschiede spielen beim Nachweis von RT-Aktivität keine Rolle.

Ein ausführlicher Vergleich durch Bürgisser 2000 von unterschiedlichen Methoden zur Viruslastbestimmung mit einem PERT-Assay kann die grundsätzliche Subtypen-Unabhängigkeit weiter belegen trotz natürlicher Schwankungen des Verhältnisses zwischen Genomkopienanzahl und RT-Aktivität (s. a. 4.5.4)

4.5.3 RT-Aktivitätsnachweis bei bisher unbekanntem Retroviren

Verfahren wie PERT haben gegenüber PCR-Nachweisen von Retroviren den Vorteil der Unabhängigkeit von der viralen Nukleinsäuresequenz. Stattdessen wird das, den Retroviren gemeinsame Prinzip der reversen Transkription benutzt. Ein Zusammenhang zwischen Retroviren und Motoneuron-Erkrankungen wird seit einiger Zeit untersucht (Andrews 2000). So konnte z.B. bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) RT-Aktivität in 43 Prozent im Serum nachgewiesen werden (Steele 2005). In nicht Blutsverwandten, gesunden Personen konnte nur in 18 % RT-Aktivität im Serum nachgewiesen werden. Bei Blutsverwandten von ALS-Patienten fand man eine ähnlich hohe Rate von nachweisbarer RT-Aktivität, wie bei den Erkrankten. Die Autoren vermuten in diese Daten einen Hinweis für ein endogenes Retrovirus als Faktor für die Entstehung von ALS .

Der Nachweis von RT-Aktivität in mehreren Melanoma-Zell-Linien wiederum konnte mit der Hilfe eines PERT-Assays, zur Festlegung des Kompartiments mit der höchsten Virus-konzentration, auf eine Kontamination mit Murine leukemia virus zurückgeführt werden (Deichmann 2005).

4.5.4 RT-Last und Viruslast als Parameter für virale Fitness

Ein sehr interessanter Effekt ist das Auftreten von sogenannter Hypermutation des HIV-Genoms, was zu vielen nicht reproduktionsfähigen HI-Viren führt. Defekte Viren können aber auch durch Inhibierung der Prozessierung der Protein-Precursor mit Protease-Inhibitoren entstehen. Diese Viren geben beim quantitativen PCR-Nachweis das gleiche Ergebnis, wie ihre voll funktionsfähigen Varianten. Eine Überlegung wäre somit, einen Surrogatparameter für die Infektiosität der Partikel mit einem anderen zu vergleichen. Eine größere Menge voll infektiöser Partikel sollte somit einen höheren Wert des Quotienten

$\frac{RT - Aktivität}{VL}$ besitzen als vergleichbare hypermutierte Viren, wenn bei diesen der Defekt in der RT liegt. Aktive RT, als der zu vergleichende Parameter, bietet sich vor allem wegen des vor der Integration des Virengenoms notwendigen Schrittes der Umschreibung des viralen RNA-Genoms an. Das Schwankungen im Verhältnis von RT Aktivität und Viruslast vorkommen konnte bereits durch Garcia-Lerma gezeigt werden (Garcia-Lerma 1998).

4.5.5 Schneller phänotypischer Nachweis für Resistenzen gegen die RT

In einem Proof-of-Concept Versuch konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, das ein phänotypischer Resistenztest mittels eines hochsensitiven RT-Aktivitäts-Nachweises möglich ist. Dies gilt auch für AZT, was bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Die einzige in der Literatur beschriebene Anwendung eines PERT-Verfahrens zur Bestimmung der Empfindlichkeit von reverser Transkriptase gegen AZT findet sich bei André et al. (André 2000). Es wird hier jedoch nur die Auswirkung von AZT auf RT-Aktivität in Impfstoffen untersucht.

Mithilfe dieses Assays konnte aber bei einem bekannt resistentem HIV-Isolat phänotypisch Resistenz gegen AZT (bzw. dessen Metabolit) gezeigt werden. Ausschlaggebend ist hierfür wahrscheinlich die deutlich längere benötigte Schreibstrecke der RT in dem hier beschriebenen Test, um anschließend ein PCR-Produkt zu erzeugen. Dies erhöht die

Wahrscheinlichkeit des Einbaus von AZT-TP und damit die Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruchs. Für 3TC und Nevirapin (einem NNRTI) konnte die Möglichkeit zum phänotypischen Resistenztest auch mit den bereits beschriebenen Verfahren gezeigt werden (Vazquez-Rosales 1999, Garcia-Lerma 1999, Garcia-Lerma 2002).

Der Vorteil eines solchen phänotypischen Resistenztests wäre vor allem ein deutlich schnelleres Ergebnis ohne Wartezeiten von mehreren Wochen.

Ein ungelöstes Problem ist aber die Beschaffung der aktiven Metaboliten der einzelnen Inhibitoren, die im Handel nicht verfügbar sind.

Daneben ist auch die Problematik des Bedarfs von Resistenztests bei niedrigen Viruslasten (~1000 Kopien/ml) zu sehen, die eine gute Aussage bei direkter Resistenztestung für dieses Verfahren sehr schwierig machen wird. Um für solch niedrige Viruslasten einen phänotypischen Resistenztest durchzuführen wird als vorausgehender Schritt die rekombinante Expression von Patienten-RT notwendig sein. Dies würde aber wiederum neben der Dauer für die Durchführung auch die Kosten des Verfahrens in die Höhe treiben.

Bei ausreichender Menge von RT stellt sich aber die Frage ob nicht auch ein konventioneller RT-Assay für die Beantwortung ob eine Substanz inhibitorisch wirkt ausreichend ist. Für NNRTIs muss diese Frage mit ja beantwortet werden, da mittels dieses relativ einfachen Verfahrens leicht sehr unterschiedliche Substanzen (sogar Phytopharmaka s. Kanyara 2005) auf ihre grundsätzliche Wirksamkeit untersucht werden können. Bei NRTIs ist dies vom benutzten homopolymeren Template abhängig. So kann mit einem Poly-A Template nur auf Resistenz gegen Thymidin-Analoga getestet werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Vereinfachung und Optimierung der bekannten hochsensitiven RT-Nachweisverfahren. Hochsensitive RT-Nachweisverfahren bestehen aus der Generierung von cDNA aus einem heteropolymeren Template mit anschließender Amplifikation der entstandenen cDNA mittels PCR. Bei den ersten in der Literatur beschriebenen Verfahren zum hochsensitiven RT-Aktivitätsnachweis mit PCR-Amplifikationsschritt (PERT, Pyra 1994; AmpRT, Heneine 1995) handelt es sich um qualitative Verfahren mit Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid Färbung der PCR-Produkte als Read-out. Von diesen beschriebenen Verfahren wurde die Auswahl des heteropolymeren RNA-Templates und der grundsätzliche Ablauf, sowie einige Überlegungen zur Optimierung übernommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue, optimierte Primersequenzen für den RT-Schritt sowie für den PCR-Amplifikationsschritt entworfen. Diese Primersequenzen ermöglichen die Untersuchung der RT-Aktivität im Verlauf des RNA-Templates sowie die Untersuchung des Einflusses von RT-Inhibitoren.

Es wurden die üblichen Optimierungsschritte wie $MgCl_2$ -Titration, Titration der Primerkonzentration und Variation der Annealing-Temperatur durchgeführt.

Um eine Kontamination im Sinne eines Carry-over von PCR-Produkten zu verhindern, wurde ein UNG/dUTP System integriert und in seiner Wirksamkeit überprüft.

Zwei verschiedene quantitative Read-out Verfahren wurden verglichen:

Die Bestimmung der Menge an entstandenem PCR-Produkt am Ende des PCR-Schrittes stellte sich als arbeitsaufwändig heraus und ermöglichte nur einen geringen linearen Messbereich. Die Real-Time-Quantifizierung zeigte dagegen einen weiten linearen Messbereich und benötigt nach dem PCR-Schritt keine zusätzlichen Arbeitsschritte. Es konnte somit die Überlegenheit des Nachweises mittels Real-Time-PCR im Vergleich zur Endpunkt-Bestimmung gezeigt werden. Zur Real-Time Quantifizierung wurde für die Fluoreszenz-Detektion statt einer Exonuklease-Sonde (TM-PERT, TaqMan-Verfahren, z.B. von Maudru 1998 beschrieben) ein Molecular Beacon verwendet. Auch hier wurden die üblichen Optimierungsverfahren (Sonden-Titration, Einsaatmenge cDNA) durchgeführt.

Mit dem entwickelten Verfahren können so geringste Mengen von RT-Aktivität, entsprechend ca. 40 Viruspartikeln mit hoher Kontaminationssicherheit und hoher Spezifität nachgewiesen werden. Es konnte das Ansprechen auf nukleosidische RT-Inhibitoren gesteigert werden, mit der Möglichkeit phänotypische Resistenztests auch gegen AZT durchzu-

führen.

Zahlreiche viel versprechende Anwendungsgebiete des RT-Aktivitäts Nachweises mit dem hier etablierten Test sind jedoch derzeit für die Routineanwendung nicht zugänglich, solange die Probleme durch unspezifische Inhibitoren, wie sie beispielsweise im Blutplasma vorkommen, nicht gelöst sind. Um dieses Nachweisverfahren für die virologische Diagnostik einzuführen, wird ein stabiles und einfaches Aufreinigungsverfahren für RT aus Blutplasma von Patienten benötigt.

6 Protokoll für den Nachweis von RT-Aktivität in Zellkultur-überständen

Schritt 1:

Ansetzen des RT-Reaktionspuffers 5R10M10T

<i>Substanz</i>	<i>Molarität</i>
KCl	250 mM
Tris-HCl pH 8,3	50 mM
MgCl ₂	50 mM
EGTA	4 mM
DTT	50 mM

Fertig angesetzter Puffer 5R10M10T kann bei -20°C aufbewahrt werden.

Schritt 2:

Ansetzen des Lysis-Reagenz

Lysis-Reagenz für eine Reaktion:

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
5R10M10T	20 µl
10% Triton X-100	2 µl
H ₂ O	8 µl

Schritt 3:

Ansetzen der Primer/Template Mischung

<i>Substanz</i>	<i>Konz.</i>
MS2-RNA	0,26 µM
RT-Primer	9 µM
DTT	2,5 mM
RNase-Inhibitor	0,4 U/µl

Pro Reaktionsansatz werden 3µl der Primer/Template Mischung benötigt.

Vor Verwendung muss die Primer/Template Mischung einmal für 5 Minuten auf 95°C erhitzt werden, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert werden und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert werden.

Schritt 4:

RT-Schritt

Einfachreaktionsansatz RT-Reaktion

Substanz	Menge
Puffer 5R10M10T	6 µl
Primer/Template Mischung	3 µl
Nukleotid-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 3mM)	6 µl
Wasser (a.d.)	14,1 µl
RNase-Inhibitor (40 Units/µl)	0,9 µl

Zusammen mit 60 µl des Lysis-Ansatzes ergibt dies ein Gesamtvolumen für die RT-Reaktion von 90 µl. Der Reaktionsansatz wird 240 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird danach durch 7 minütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt und danach bis zur Weiterverwendung bei 4°C gekühlt.

Schritt 5:

PCR-Schritt

Einfachreaktionsansatz PCR-Schritt

Substanz	Menge
LC DNA Master-Mix	2 µl
HybProbe	
Beacon 10 mM	1,2 µl
UNG 1U/µl	1 µl
RNase DNase-frei 0,5 µg/µl	1,5 µl
Primer 10mM	2 µl
a.d.	2,3 µl

Zusammen mit 10 µl aus dem Produkt des RT-Schrittes ergibt dies ein Gesamtvolumen der PCR-Reaktion von 20 µl. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes wird in den Konus einer LightCycler-Kapillare gefüllt und in die Kapillare zentrifugiert.

Es wird folgendes PCR-Protokoll auf dem LightCycler verwendet:

Abschnitt	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
RNAse Verdau, De-uracilierung, Aktivieren der Polymerase	Deuracilierung	35	300
	Verdau	40	300
	Denaturierung	95	300
Amplifikation 45 Zyklen	Denaturierung	95	5
	Annealing	55	5 (Messpunkt)
	Elongation	72	5
Post-PCR	Kühlen	35	

Abhängig von der Auswahl der Proben kann das Ergebnis qualitativ ausgewertet werden. Bei quantitativer Auswertung müssen entsprechende Standards mitgeführt werden und in der LightCycler-Software entsprechend definiert werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des HIV (nach Modrow 1997).....	7
Abbildung 2: Räumliche Ansicht des Aufbaus von HIV (http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/STRUCTURE/INDEX.HTML).....	8
Abbildung 3: HIV-Genomaufbau (nach Modrow 1997).....	8
Abbildung 4: Replikationszyklus des HI-Virus (nach Modrow 1997).....	9
Abbildung 5: Räumliche Struktur des HIV.....	11
Abbildung 6: Ablauf der Erst- und Zweitstrangsynthese im Rahmen des Replikationszyklus (nach Modrow 1997).....	12
Abbildung 7: Ablauf des RT-Schritts.....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung des PCR-Schritts.....	33
Abbildung 9: FRET-Sonden.....	40
Abbildung 10: Ergebnisse der Sekundärstrukturuntersuchung mit DNA-Mfold.....	42
Abbildung 11: PCR-Verlauf und Messzeitpunkt.....	42
Abbildung 12: Abhängigkeit der Sensitivität von der MgCl ₂ -Konzentration.....	44
Abbildung 13: Falsche Größe des PCR-Produktes PI mit Rt3529.....	45
Abbildung 14: Bindung des RT-Primers Rt3529 an geplanter Stelle.....	46
Abbildung 15: Bindung des RT-Primers an zusätzlicher Stelle.....	46
Abbildung 16: Richtige Größe des PCR-Produktes PI mit Prt 3543.....	46
Abbildung 17: Effektivität der UNG.....	47
Abbildung 18: RNase Titration.....	48
Abbildung 19: Optimierung FastStart-Protokoll mit Beacon (Fluoreszenz).....	50
Abbildung 20: Optimierung FastStart-Protokoll Magnesiumchlorid Werte.....	50
Abbildung 21: Sensitivität Beacon.....	51
Abbildung 22: Sensitivität Beacon negative und positive Kontrolle.....	52

Abbildung 23: Nachweis von RT-Aktivität in Plasma.....	53
Abbildung 24: ROC-Kurven des Nachweises synthetischer RT.....	55
Abbildung 25: RT-Aktivität in verschiedenen Zell-Präparationen.....	56
Abbildung 26: Inhibition durch 3TC-TP.....	57
Abbildung 27: Inhibition durch AZT-TP.....	58

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NRTI und ihre zugrunde liegenden Nukleoside.....	14
Tabelle 2: Reaktionspufferkonzentration	22
Tabelle 3: Lysisreagenz.....	22
Tabelle 4: Notation Resistenzen:.....	23
Tabelle 5: Mutationen MvP-08801-99.....	23
Tabelle 6: Analyse des Pol-Fragments vom Start der Protease bis Aminosäure 333 der RT von MvP-08801-99.....	24
Tabelle 7: Resistenzalgorithmen.....	24
Tabelle 8: Ablauf RT-Schritt	27
Tabelle 9: Reaktionsbedingungen Annealing.....	27
Tabelle 10: Nukleotid-Mix RT-Schritt.....	27
Tabelle 11: Reaktionsansatz RT-Schritt.....	28
Tabelle 12: RT-Primer	28
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen Amplitaq Gold.....	30
Tabelle 14: 1xAnsatz für den LightCycler.....	30
Tabelle 15: PCR-Schritt mit Amplitaq Gold.....	31
Tabelle 16: PCR-Schritt mit LightCycler DNA Master und Taq-Antikörper.....	31
Tabelle 17: PCR-Schritt mit LightCycler DNA Master.....	32
Tabelle 18: Verwendete PCR-Primer und Sonden.....	34
Tabelle 19: PCR-Produkte	35
Tabelle 20: Zusammensetzung 10xWaschpuffer für Endpunktmessung:.....	38
Tabelle 21: Ablauf Endpunktsbestimmungen.....	38
Tabelle 22: Beacon.....	41

Tabelle 23: Vierfelder-Tafel zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität
von Zellkulturüberständen..... 54

9 Literaturverzeichnis

- M. André, S. Morgeaux und F. Fuchs, 'Quantitative detection of RT activity by PERT assay: feasibility and limits to a standardized screening assay for human vaccines', *Biologicals* 2000 28(2), 67-80
- W. D. Andrews, P. W. Tuke, A. Al-Chalabi, P. Gaudin, S. Ijaz, M. J. Parton und J. A. Garson, 'Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease', *J Med Virol* 2000 61(4), 527-532
- B. A. Arnold, R. W. Hepler und P. M. Keller, 'One-step fluorescent probe product-enhanced reverse transcriptase assay', *Biotechniques* 1998 25(1), 98-106
- J. Balzarini, 'Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives', *Pharm World Sci* 1994 16(2), 113-126
- J. Böni, H. Pyra und J. Schüpbach, 'Sensitive detection and quantification of particle-associated reverse transcriptase in plasma of HIV-1-infected individuals by the product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay', *J Med Virol* 1996 49(1), 23-28
- K. Brorson, P. G. Swann, E. Lizzio, T. Maudru, K. Peden und K. E. Stein, 'Use of a quantitative product-enhanced reverse transcriptase assay to monitor retrovirus levels in mAb cell-culture and downstream processing', *Biotechnol Prog* 2001 17(1), 188-196
- K. Brorson, Y. Xu, P. G. Swann, E. Hamilton, M. Mustafa, C. de Wit, L. A. Norling und K. E. Stein, 'Evaluation of a quantitative product-enhanced reverse transcriptase assay to monitor retrovirus in mAb cell-culture', *Biologicals* 2002 30(1), 15-26
- P. Bürgisser, P. Vernazza, M. Flepp, J. Böni, Z. Tomasik, U. Hummel, G. Pantaleo und J. Schüpbach, 'Performance of five different assays for the quantification of viral load in persons infected with various subtypes of HIV-1. Swiss HIV Cohort Study', *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 23(2), 138-144
- R. Cantin, J. F. Fortin und M. Tremblay, 'The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific', *Virology* 1996 218(2), 372-381
- A. Chang, J. M. Ostrove und R. E. Bird, 'Development of an improved product enhanced reverse transcriptase assay', *J Virol Methods* 1997 65(1), 45-54

- A. Chang und S. Dusing, 'Practical assay issues with the PERT/PBRT assay: a highly sensitive reverse transcriptase assay', *Dev Biol (Basel)* 2006 123(), 91-7; discussion 119-32
- M. Deichmann, J. B. Huder, C. Kleist, H. Näher, J. Schüpbach und J. Böni, 'Detection of reverse transcriptase activity in human melanoma cell lines and identification of a murine leukemia virus contaminant', *Arch Dermatol Res* 2005 296(8), 345-352
- H. Doerr, 'Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und Typ 2' in 'Labor und Diagnose', 5. Ausgabe 1998, Hrsg.: L. Thomas, TH-Books Verlagsgesellschaft, ISBN: 3980521532
- J. Eberle und R. Seibl, 'A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA', *J Virol Methods* 1992 40(3), 347-356
- M. B. Faletto, W. H. Miller, E. P. Garvey, M. H. St Clair, S. M. Daluge und S. S. Good, 'Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89', *Antimicrob Agents Chemother* 1997 41(5), 1099-1107
- A. Franklin, P. J. Milburn, R. V. Blanden und E. J. Steele, 'Human DNA polymerase-eta, an A-T mutator in somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes, is a reverse transcriptase', *Immunol Cell Biol* 2004 82(2), 219-225
- J. G. García Lerma, S. Yamamoto, M. Gómez-Cano, V. Soriano, T. A. Green, M. P. Busch, T. M. Folks und W. Heneine, 'Measurement of human immunodeficiency virus type 1 plasma virus load based on reverse transcriptase (RT) activity: evidence of variabilities in levels of virion-associated RT', *J Infect Dis* 1998 177(5), 1221-1229
- J. García Lerma, R. F. Schinazi, A. S. Juodawlkis, V. Soriano, Y. Lin, K. Tatti, D. Rimland, T. M. Folks und W. Heneine, 'A rapid non-culture-based assay for clinical monitoring of phenotypic resistance of human immunodeficiency virus type 1 to lamivudine (3TC)', *Antimicrob Agents Chemother* 1999 43(2), 264-270
- J. G. García Lerma, V. Soriano, A. Mas, M. E. Quiñones-Mateu, E. J. Arts und W. Heneine, 'Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 group O load in plasma by measuring reverse transcriptase activity', *J Clin Microbiol* 2000 38(1), 402-405
- J. Gerardo García-Lerma und Walid Heneine, 'Rapid biochemical assays for phenotypic drug resistance testing of HIV-1', *J Antimicrob Chemother* 2002 50(6), 771-774
- V. L. Greengrass, S. P. Turnbull, J. Hocking, A. L. Dunne, G. Tachedjian, G. E. Corrigan und S. M. Crowe, 'Evaluation of a low cost reverse transcriptase assay for plasma HIV-1 viral load monitoring', *Curr HIV Res* 2005 3(2), 183-190

- N. Guex und M. C. Peitsch, 'SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling', *Electrophoresis* 1997 18(15), 2714-2723
- W. Heneine, S. Yamamoto, W. M. Switzer, T. J. Spira und T. M. Folks, 'Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1', *J Infect Dis* 1995 171(5), 1210-1216
- S. Hochberger, D. Althof, R. Gallegos de Schrott, N. Nachbaur, H. Röck und H. Laying, 'Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system', *J Clin Virol* 2006 35(4), 373-380
- Y. Hsiou, J. Ding, K. Das, A. D. Clark, P. L. Boyer, P. Lewi, P. A. Janssen, J. P. Kleim, M. Rösner, S. H. Hughes und E. Arnold, 'The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance', *J Mol Biol* 2001 309(2), 437-445
- J. N. Kanyara und E. N M Njagi, 'Anti-HIV-1 activities in extracts from some medicinal plants as assessed in an in vitro biochemical HIV-1 reverse transcriptase assay', *Phytother Res* 2005 19(4), 287-290
- D. A. Katzenstein, S. M. Hammer, M. D. Hughes, H. Gundacker, J. B. Jackson, S. Fiscus, S. Rasheed, T. Elbeik, R. Reichman, A. Japour and T. C. Merigan, M. S. Hirsch, 'The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV-infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Study Team', *N Engl J Med* 1996 335(15), 1091-1098
- R. Kothapalli, G. M. Danyluck, R. D. Bailey und T. P. Loughran, 'Problems associated with product enhancement reverse transcriptase assay using bacteriophage MS2 RNA as a template', *J Virol Methods* 2003 109(2), 203-207
- J. A. Lewis, E. L. Brown und P. A. Duncan, 'Approaches to the release of a master cell bank of PER.C6 cells; a novel cell substrate for the manufacture of human vaccines', *Dev Biol (Basel)* 2006 123(), 165-76; discussion 183-97
- A. Lovatt, J. Black, D. Galbraith, I. Doherty, M. W. Moran, A. J. Shepherd, A. Griffen, A. Bailey, N. Wilson und K. T. Smith, 'High throughput detection of retrovirus-associated reverse transcriptase using an improved fluorescent product enhanced reverse transcriptase assay and its comparison to conventional detection methods', *J Virol Methods* 1999 82(2), 185-200

A. Malmsten, X. Shao, K. Aperia, G. E. Corrigan, E. Sandström, C. F. R. Källander, T. Leitner und J. S. Gronowitz, 'HIV-1 viral load determination based on reverse transcriptase activity recovered from human plasma', *J Med Virol* 2003 71(3), 347-359

T. Maudru und K. Peden, 'Elimination of background signals in a modified polymerase chain reaction-based reverse transcriptase assay', *J Virol Methods* 1997 66(2), 247-261

T. Maudru und K. W. Peden, 'Adaptation of the fluorogenic 5'-nuclease chemistry to a PCR-based reverse transcriptase assay', *Biotechniques* 1998 25(6), 972-975

J. Miskin, D. Chipchase, J. Rohll, G. Beard, T. Wardell, D. Angell, H. Roehl, D. Jolly, S. Kingsman und K. Mitrophanous, 'A replication competent lentivirus (RCL) assay for equine infectious anaemia virus (EIAV)-based lentiviral vectors', *Gene Ther* 2006 13(3), 196-205

S. Modrow, 'HIV und Retroviren' in 'Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner', 1. Ausgabe 1997, Hrsg.: S. Modrow und D. Falke, Spektrum Akad. Vlg., ISBN: 3860252747

F. Odawara, H. Abe, T. Kohno, Y. Nagai-Fujii, K. Arai, S. Imamura, H. Misaki, H. Azuma, K. Ikebuchi, H. Ikeda, S. Mohan und K. Sano, 'A highly sensitive chemiluminescent reverse transcriptase assay for human immunodeficiency virus', *J Virol Methods* 2002 106(1), 115-124

H. Pyra, J. Böni und J. Schüpbach, 'Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement', *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 91(4), 1544-1548

J. Ren, J. Milton, K. L. Weaver, S. A. Short, D. I. Stuart und D. K. Stammers, 'Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase', *Structure* 2000 8(10), 1089-1094

P. Rice, I. Longden und A. Bleasby, 'EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite', *Trends in Genetics* 2000 16(6), 276-277

J. SantaLucia, 'A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics', *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95(4), 1460-1465

L. Sastry, Y. Xu, L. Duffy, S. Koop, A. Jasti, H. Roehl, D. Jolly und K. Cornetta, 'Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection', *Hum Gene Ther* 2005 16(10), 1227-1236

- J. F. Sears, R. Repaske und A. S. Khan, 'Improved Mg²⁺-based reverse transcriptase assay for detection of primate retroviruses', *J Clin Microbiol* 1999 37(6), 1704-1708
- J. F. Sears und A. S. Khan, 'Single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay with Ampliwax (STF-PERT) for retrovirus quantitation', *J Virol Methods* 2003 108(1), 139-142
- J. Silver, T. Maudru, K. Fujita und R. Repaske, 'An RT-PCR assay for the enzyme activity of reverse transcriptase capable of detecting single virions', *Nucleic Acids Res* 1993 21(15), 3593-3594
- A. J. Steele, A. Al-Chalabi, K. Ferrante, M. E. Cudkowicz, R. H. Brown und J. A. Garson, 'Detection of serum reverse transcriptase activity in patients with ALS and unaffected blood relatives', *Neurology* 2005 64(3), 454-458
- G. Vázquez-Rosales, J. G. García Lerma, S. Yamamoto, W. M. Switzer, D. Havlir, T. M. Folks, D. D. Richman und W. Heneine, 'Rapid screening of phenotypic resistance to nevirapine by direct analysis of HIV type 1 reverse transcriptase activity in plasma', *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999 15(13), 1191-1200
- C. Voisset, R. R. Tönjes, P. Breyton, B. Mandrand und G. Paranhos-Baccalà, 'Specific detection of RT activity in culture supernatants of retrovirus-producing cells, using synthetic DNA as competitor in polymerase enhanced reverse transcriptase assay', *J Virol Methods* 2001 94(1-2), 187-193
- H. Wörle, H.-J. Rumpf und J. Erven, 'Taschenbuch der Mathematik. Mit zahlreichen Beispielen und Aufgaben samt Lösungen', 12. Auflage 1994, Oldenbourg Verlag
- Michael Zuker, 'Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction', *Nucleic Acids Res* 2003 31(13), 3406-3415

10 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Eberle bedanken, der mir die Möglichkeit für diese Dissertationsarbeit gegeben hat, der mir immer neue Anregungen bei offenen Fragen geben konnte und mir großzügige Freiräume bei der Bearbeitung des Themas gelassen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den im Labor tätigen technischen Assistentinnen, besonders Ulrike Claar und Gaby Pleyl, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großer Dank geht auch an meine Frau Friederike Obermeier, die mich während der gesamten Dissertationsarbeit unterstützte.

11 Lebenslauf

Geboren am 30.05.1975 in Landshut

Ausbildung 1985-1994 Hans-Leinberger-Gymnasium Landshut
Allgemeine Hochschulreife

1994-1995 Zivildienst im Rettungsdienst des BRK Fronthausen als Rettungsdiensthelfer

1995-2002 Ludwig Maximilians Universität München Studium der Humanmedizin, 3. Medizinisches Staatsexamen am Nov. 2002

Von 1.3.2003 bis 29.2.2004 Tätigkeit als AiP im Max von Pettenkofer-Institut in der virologischen Diagnostik.

Von 1.3.2004 bis 31.8.2004 Tätigkeit als AiP am Krankenhaus München Schwabing in der Abteilung Infektiologie und Tropenmedizin

Seit 1.9.2004 Tätigkeit als approbierter Arzt im Max von Pettenkofer-Institut in der virologischen Diagnostik.

Doktorand bei Prof. Dr. Eberle. Doktorarbeit zum Thema hochempfindliche RT Assays.

Interessen

Bioinformatik

dreidimensionale Visualisierung

Internet (Programmierung von passiven und aktiven Inhalten unter Verwendung von Perl, Javascript, SQL und HTML)

Im Rahmen dessen:

Betreuung des Webservers des Max-von-Pettenkofer Instituts in der Innenstadt von 05/1999 bis 05/2001

Programmierung und Betreuung des Internetpraktikums im Rahmen des IKI-Kurses des München Harvard-Projekts in den Semestern SoSe 2000 bis SoSe 2002

- Publikationen
- Highly Sensitive Quantification of HIV RT Activity – Method and Possible Applications
Martin Obermeier, Markus Opgen-Rhein, Josef Eberle
Poster P-177 auf dem Convir-Kongress 2000
Abstract in Infection 2000;28 (Suppl1):46
 - Detection of Vaccinia-specific antibodies in the German population
Obermeier M., Nitschko H., Chaplin P., Mateo L., Jäger G.
Poster P 91 auf dem Convir Kongress 2004
Abstract in Infection 2004;32 (Suppl1):30
 - Informationszeitalter und Mikrobiologie am Beispiel des NRZ für Borrelien
Lorenz Leitritz, Martin Obermeier, Bettina Wilske, Volker Fingerle
Der Mikrobiologe 14. Jahrgang, Heft 4 : 151
- Webserver
- Seit 05/1999 Betreuung des Webservers am Max von Pettenkofer Institut. Seit 05/2001 hauptsächlich administrative und beratende Funktion für die gehosteten Institutionen (MvP-Homepage, FoeFoLe, MTA-Schule, NRZ-Borrelien, und bis SoSE 2002 Internetseiten des IKI-Kurses des Harvard-München-Programmes.
(<http://www.mvp.uni-muenchen.de>, <http://nrz-borrelien.lmu.-de>)
 - Seit 05/2003 Betreuung des Bioinformatik-Webservers und der Bioinformatik-Applikationen am Max von Pettenkofer-Institut.
(<http://www.bioinformatix.org>)