

Aus dem Lehrstuhl für Virologie des Max von Pettenkofer-Institutes,
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Koszinowski

Ein neuartiges enzymatisches Auswerteverfahren für die *in vitro*
Detektion phänotypischer HIV-1 Proteaseresistenz

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

vorgelegt von

Dieter Hoffmann
aus Temeschburg

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Koszinowski

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Fink
Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Nitschko

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2002

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
A Einleitung	3
A.1 Morphologie, Struktur und genomische Organisation von HIV	3
A.2 Biochemische Eigenschaften der HIV-1 Protease.....	5
A.3 Pharmakotherapie der HIV-Infektion.....	6
A.4 Resistenz gegen HIV-Chemotherapeutika	7
A.5 Möglichkeiten der HIV-Resistenzmessung.....	8
A.5.1 Genotypische Resistenztests	8
A.5.2 Phänotypische Resistenztests	9
A.5.2.1 Phänotypische Resistenzmessung in Zellkultur	9
A.5.2.2 Enzymatische phänotypische Resistenztests	10
A.5.2.3 Analytische und klinisch relevante Grenzwerte („Cut-off“ Werte).....	10
A.5.3 Vergleich phänotypischer und genotypischer Resistenztests.....	11
A.5.4 Indikationen für die Bestimmung der HIV-Resistenz.....	12
A.6 Hintergrund des Projektes	13
A.7 Aufgabenstellung.....	15
B Material und Methoden.....	17
B.1 Geräte und Software.....	17
B.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
B.3 Chemikalien.....	19
B.3.1 Enzyme	19
B.3.2 Substrate für die HIV Protease.....	20
B.3.3 Inhibitoren der HIV Protease	20
B.3.4 DNA- und Protein-Größenstandards.....	20
B.3.5 Kits zur DNA-Extraktion	20
B.3.6 Farbstoffe	21
B.3.7 HIV-Isolate.....	21
B.3.8 Expressionsvektor	21
B.3.9 Oligonukleotide.....	21
B.3.10 Elektroporationskompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
B.3.11 Antikörper	21

B.4	Lösungen, Puffer und Medien.....	22
B.4.1	Medien	24
B.5	Molekularbiologische Methoden.....	24
B.5.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24
B.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	24
B.5.3	Extraktion der proviralen HIV-1 DNA aus Leukozyten.....	25
B.5.4	Amplifikation des HIV PR Gens mittels „single“ PCR.....	25
B.5.5	Extraktion der RNA und PCR im Rahmen der Virusdiagnostik	26
B.5.6	Ermittlung der Sequenz des HIV PR-Gens	27
B.5.7	Restriktion der HIV Protease Amplifikate	27
B.5.8	Ligation.....	28
B.5.9	Aufreinigung des Ligationsproduktes für die Elektrotransformation.....	29
B.5.10	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	29
B.6	Mikrobiologische Methoden	30
B.6.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
B.6.2	Elektrotransformation	30
B.6.3	Rekombinante Expression der HIV-1 Protease	30
B.7	Proteinchemische Methoden	31
B.7.1	Gewinnung der rekombinant exprimierten Protease.....	31
B.7.2	Anreicherung der WT Protease.....	32
B.7.3	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	32
B.7.4	SDS-PAGE	33
B.7.5	Silberfärbung des SDS- Proteingels.....	33
B.7.6	Nachweis der HIV Protease im Western Blot.....	34
B.8	Fluoreszenzsubstrate und ihre Verwendung zur Messung der HIV-1 Protease	35
B.9	Testprinzip.....	36
B.10	Proteaseaktivitätsmessung im Küvettenformat.....	37
B.10.1	Allgemeines.....	37
B.10.2	Versuchsdurchführung	37
B.10.3	Weiterverarbeitung der Messdaten mit Flucol4 und Flukin49.....	38
B.11	Aktivitätsmessung im Mikrotiterplattenformat.....	38
B.11.1	Allgemeines.....	38
B.11.2	Versuchsdurchführung	39

B.11.3	Erstellung einer Eichkurve mit EDANS	40
B.12	Theoretische Grundlagen der Enzyminhibition	42
B.13	Enzymkinetische Auswertung mit Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_i) des Enzym-Inhibitor-Komplexes.....	44
B.14	Berechnung der Resistenzfaktoren.....	46
C	Ergebnisse	47
C.1	Etablierung und Optimierung des Fluoreszenzassays und seiner Auswertung	47
C.1.1	Substrat- und DMSO-Konzentration	47
C.1.2	Stabilisierende Adjuvantien.....	49
C.1.3	Handhabung der PI, des Assay Puffers und des Fluoreszenzsubstrates.....	52
C.1.4	Vergleich der Fluoreszenzspektren von EDANS und des Spaltproduktes PIVQ-EDANS.....	53
C.1.5	Vergleich der Fluoreszenz von PIVQ-EDANS-Lösungen verschiedener Konzentrationen.....	55
C.1.6	Fluoreszenzsignal in Gegenwart unterschiedlicher EDANS- und Substratkonzentrationen.....	57
C.1.7	Korrektur des „inner filter effect“	59
C.2	Bestimmung der Michaelis-Konstante K_m einer WT- und einer aus Patientenmaterial exprimierten Protease	60
C.3	Titration des aktiven Zentrums der HIV Protease.....	62
C.4	Auswertung der in Küvetten gemessenen HIV Proteasen.....	64
C.5	Untersuchung der Wildtyp HIV Protease im Küvettenformat	67
C.6	Messung von Patientenproteasen im Küvettenformat.....	69
C.6.1	Kinetische Analyse 3 hochresistenter, aus Patientenmaterial exprimierter Proteasen	69
C.6.2	Untersuchung genotypisch intermediär resistenter bzw. sensitiver HIV PR aus Patientenmaterial	71
C.7	Fluoreszenzmessungen im Mikrotiterplattenformat Fehler! Textmarke nicht definiert.	
C.8	Bestimmung der Dissoziationskonstanten für WT PR und therapeutisch eingesetzte PI	74
C.9	Untersuchung von aus Patientenmaterial exprimierten Proteasen im Mikrotiterplattenformat.....	74
C.9.1	Messung von 3 hochresistenten Proteasen aus Patientenmaterial	74

C.9.2	Messung von Proteasen aus Patientenmaterial mit niedriger bzw. intermediärer Resistenz	76
C.9.3	Untersuchung von definierten Mischungen aus hochresistenten Proteasen und Wildtyp	77
C.10	Vergleich der Messergebnisse zwischen Küvetten- und Mikrotiterplattenformat	78
D	Diskussion	80
D.1	Ziel der vorliegenden Arbeit	80
D.2	Konzept und Schlussfolgerungen der bisher durchgeführten Untersuchungen	82
D.3	Zusammenfassende Bewertung des gesamten Resistenztests zum aktuellen Stand	84
D.4	Vergleich des vorliegenden Assays mit Zellkultur-basierter Resistenzbestimmung	86
D.4.1	Zeitbedarf für gesamten Resistenztest bei Auswertung im Mikrotiterplattenformat	87
D.4.2	Sensitivität	87
D.4.3	Kosten für gesamten Resistenztest	88
D.5	Vorteile und Nachteile des enzymatischen Resistenztests	89
D.6	Ausblick, zukünftige Experimente	90
D.6.1	Validierung des gesamten Resistenztests	90
D.6.1.1	Untersuchung von HIV-Referenzstämmen	90
D.6.1.2	Ermittlung analytischer (technischer) Grenzwerte	90
D.6.1.3	Korrelation der Resistenzdaten mit dem klinischen Verlauf	90
D.6.2	Expression der HIV Protease mittels gekoppelter <i>in vitro</i> Transkription/Translation	91
D.7	Nutzen des Assays in der Patientenbetreuung, mögliche Einsatzfelder	92
	LITERATURVERZEICHNIS	95
	ZUSAMMENFASSUNG	104
	DANKSAGUNG	107
	LEBENS LAUF	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aP	alkalische Phosphatase
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy-Desoxiribonukleinsäure
d	Tag
Da	Dalton
DABCYL	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ds-DNA	doppelsträngige Desoxiribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDANS	5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthalensulfonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	humanes Immundefizienzvirus
h	Stunde
IC ₅₀	50 %-ige Hemmkonzentration
K _i	Inhibitionskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	„Long terminal repeat“
M	Mol/Liter
l	Liter
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Proteaseinhibitor
PR	Protease
RNA	Ribonukleinsäure

Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPC	reversed phase chromatography
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBS	Tris-buffered saline

A Einleitung

A.1 Morphologie, Struktur und genomische Organisation von HIV

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) wurde 1983 (Barre-Sinoussi et al.) isoliert und 1984 (Gallo et al.) als Verursacher des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS) identifiziert. HIV gehört zur Familie der Retroviren. Dies sind einzelsträngige RNA-Viren, die im Virion das Enzym Reverse Transkriptase (RT) enthalten. Dadurch können sie ihre Erbinformation in doppelsträngige DNA umschreiben, die in das Wirtszellgenom integriert.

Die äußere Hülle (envelope) besteht aus Glycoprotein gp120, das über gp41 in einer Lipid-Membran verankert ist. Diese beiden Proteine sowie das Vorstufenprotein gp160 werden deshalb als ENV-Proteine zusammengefasst. Auf ihrer Innenseite bildet das p18 Matrix-Protein eine weitere Schicht mit Kontakt zu den ENV-Proteinen.

Das Eindringen von HIV in T-Helferzellen erfolgt über die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor. Das Capsid baut sich aus p24 auf und enthält 2 Moleküle RNA gekoppelt mit jeweils einem Molekül RT.

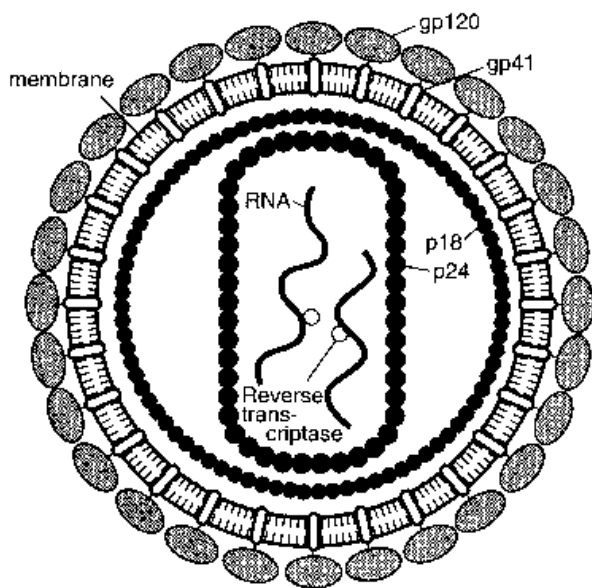


Abb. A.1. Morphologie des HI-1 Virion. (Cooper, Lawton, 1998)

Die RT ist mit dem Nucleocapsid p7 komplexiert. Zusätzlich befindet sich im Capsid Protease (PR) und Integrase (INT). Die RT katalysiert die Umschreibung von RNA in cDNA, sie hat zusätzlich RNase-Aktivität, um die RNA des DNA/RNA Hybrids bei der Synthese

doppelsträngiger DNA (ds-DNA) abzubauen. Die ds-DNA wird durch die Integrase in die genomische DNA der Wirtszelle integriert. Die Matrixproteine p17, p7, p18 und p24 gehören zu den gruppenspezifischen Antigenen (GAG). RT, PR und INT werden als POL-Proteine zusammengefasst.

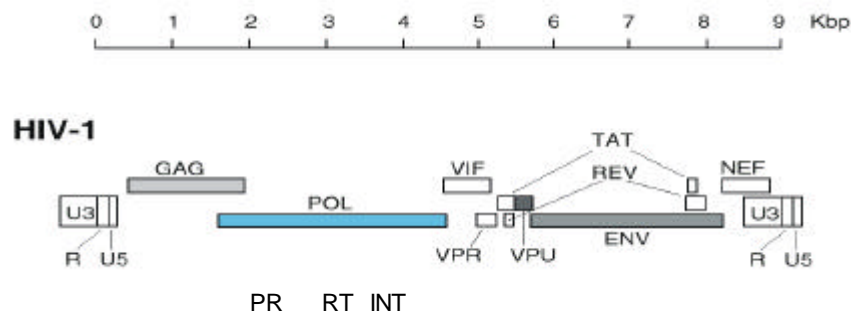


Abb. A.2. Schematische Darstellung der Genomstruktur von HIV

Das HIV-Genom besteht aus 2 Molekülen einzelsträngiger RNA mit positiver Polarität. Es umfasst ca. 10.000 bp und enthält die 3 Genbereiche gag, pol und env. Die Translation von env führt zu dem gp 160 Vorläuferprotein, das in gp120 (Oberflächenprotein) und gp41 (Transmembranprotein) gespalten wird.

Die Translation von gag führt in 95% zum Vorläuferprotein GAG. In 5% der Fälle wird durch einen ribosomalen „frameshift“ das Stopcodon in gag überlesen und ein GAG-POL-Vorläufer synthetisiert. Die Gene für die PR und die RT liegen dabei innerhalb von pol direkt benachbart (Abb. A.2). Nach autokatalytischer Freispaltung prozessiert die Protease GAG und GAG-POL Vorläufer. Gp160 wird dagegen durch zelluläre Proteasen prozessiert.

Am 5'- und 3'-Ende des Genoms befinden sich jeweils identische Sequenzbereiche, die als „long terminal repeats“ (LTR) bezeichnet werden. Sie sind für die Integration des Provirus in das Zellgenom (Colicelli et al., 1985) und für die Regulation der viralen Genexpression wichtig. Ein LTR besteht aus den 3 unabhängigen Untereinheiten U3, R und U5 (U= unique, R= redundant). Die Transkription beginnt an der U3/R Grenze des 5'-LTR und endet an der R/U5 Grenze des 3'-LTR.

Die TAT-Proteine wirken als Transaktivatoren der Transkription. Sie entfalten ihre Wirkung im Zellkern im Zusammenspiel mit den LTR. Da HIV nur einen Promotor im LTR aufweist, ist die Regulation der Genexpression auch nach der Transkription wichtig. Das REV-Protein

steuert als posttranskriptionell wirkender Transaktivator die zeitliche Abfolge der Genexpression.

Zu den akzessorischen Proteinen gehören VIF, VPR, VPU, NEF.

Replikationszyklus von HIV

Die Aufnahme von HIV in die wichtigsten Zielzellen, die T-Lymphozyten, geschieht rezeptorvermittelt. Dabei bindet gp120 an den T-Zellrezeptor, das HI-Virion wird durch gp41-vermittelte Fusion mit der Zellmembran aufgenommen. Intrazellulär entsteht durch reverse Transkription aus HIV-RNA doppelsträngige DNA. Diese wird aktiv in den Zellkern transportiert (Freed, Martin, 2001) und dort in das zelluläre Genom integriert. Durch Transkription dieser permanent integrierten Proviren entsteht wiederum HIV-RNA. Diese erfüllt abhängig von ihrer Länge verschiedene Funktionen: Ein- oder mehrfach „gespleißte“ RNA wird für die Translation viraler Proteine verwendet. „Ungespleißte“ RNA dient als „Template“ für die Translation von GAG sowie GAG/POL oder wird als vollständiges HIV-Genom in die neu entstehenden Virionen eingebaut (Modrow, Falke, 1997). Schließlich werden die Viruspartikel durch „Knospung“ freigesetzt. Sie erlangen erst jetzt durch die Aktivität der HIV PR ihre Infektiosität.

A.2 Biochemische Eigenschaften der HIV-1 Protease

Die HIV-1 Protease gehört in biochemischer Hinsicht wie andere retrovirale Proteasen zu den Aspartatproteasen (von der Helm, 1977, 1996). Diese sind im aktiven Zentrum durch ein Asp-Thr-Gly Motiv gekennzeichnet. Mit 99 Aminosäuren ist die HIV-1 PR ein ungewöhnlich kleines Protein. In der aktiven Form bildet sie ein Homodimer (Navia et al., 1989; Katz et al., 1994). Bezüglich der *in vitro* Enzymaktivität mit synthetischen Substraten liegt das pH Optimum im sauren Bereich bei pH 4,5–5,5 (Matayoshi et al., 1990; Kraft, Wang, 1994).

Die HIV PR ist Teil des Pr160^{GAG-POL} Polyproteins, das durch ribosomalen „frameshift“ zwischen den offenen Leserahmen gag und pol synthetisiert wird (A.1).

Durch ihre proteolytische Aktivität entstehen im Laufe der Bildung infektiöser Virionen aus den Vorläuferproteinen funktionsfähige virale Proteine. Die 8 Schnittstellen haben unterschiedliche Aminosäuresequenzen, die von der HIV-1 PR spezifisch erkannt werden (Tomaselli, Heinrikson, 1994).

Die *in vivo* Expression der HIV Protease (z. B. in *E. coli*) wird durch ihre Toxizität erschwert (Baum et al., 1990). Bei der Präparation aktiven Enzyms muss die Hydrophobizität berücksichtigt werden.

A.3 Pharmakotherapie der HIV-Infektion

Die kontinuierliche Verbesserung der antiretroviralen Chemotherapie hat zu einer deutlichen Senkung der Mortalität von HIV-Infizierten geführt (Gulick et al., 1997). Heute erscheint das Erreichen einer normalen Lebenserwartung bei guter Lebensqualität als realistisches Therapieziel.

Prinzipiell kann jedes HIV-Enzym durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden und daher Angriffspunkt einer antiviralen Therapie sein. Neben Hemmstoffen der Protease und der Reversen Transkriptase ist die Entwicklung von Inhibitoren der Integrase und der gp41-vermittelten Fusion von HIV mit der Zielzelle am weitesten fortgeschritten (Richman, 2001).

Die derzeit eingesetzten antiretroviralen Wirkstoffe werden in drei Klassen unterschieden:

- Nukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase (NRTI)
- Nicht-nukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase (NNRTI)
- Inhibitoren der Protease (PI)

NRTI sind Nukleosidanaloga, sie werden ebenso wie die „natürlichen“ Nukleoside in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebaut, führen aber aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch. NNRTI wirken als nichtkompetitive Inhibitoren der RT. PI hemmen die PR kompetitiv, sie binden an ihr katalytisches Zentrum, können aber nicht proteolytisch gespalten werden. Im Rahmen der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) werden heute bei den meisten HIV-Infizierten 3 Substanzen aus den obigen Wirkstoffklassen miteinander kombiniert (Department of Health and Human Services, 1998).

Diese Kombinationstherapien hemmen die HIV-Replikation sehr effektiv, bei der Mehrzahl der Patienten lässt sich die Viruslast (Anzahl Viruspartikel/ml Plasma) über mehrere Jahre unter die Nachweisgrenze der derzeit verwendeten PCR-Verfahren senken (Gulick et al., 2000). Diese beträgt bei neuentwickelten, hochempfindlichen Methoden ca. 50 Genomäquivalente/ml (Johanson et al., 2001). Eine HIV-bedingte Schädigung des Immunsystems kann so weitgehend verhindert bzw. teilweise wieder rückgängig gemacht werden (Plana et al., 2002).

Abgesehen von Einzelfallberichten in sehr frühem Infektionsstadium ist es mit den derzeitigen therapeutischen Optionen nicht möglich, HIV vollständig aus dem Körper des Patienten zu eliminieren (Pierson et al., 2000). Eine „Heilung“ der HIV-Infektion wird demnach nicht erreicht, die antiretrovirale Therapie muss daher lebenslang fortgeführt werden.

Die lange Therapiedauer und die hohe Mutationsrate von HIV fördern das Auftreten von Resistenzmutationen. Tatsächlich ist die Resistenzbildung eines der größten Probleme in der Anwendung der HAART (Richmann, 2001).

A.4 Resistenz gegen HIV-Chemotherapeutika

Resistenz gegen PI sowie RTI und NRTI wird durch Mutationen in den codierenden Sequenzen für die entsprechenden HIV-Enzyme verursacht. Wenn diese Mutationen Aminosäureaustausche bewirken, können die Enzyme so verändert werden, dass ihre Aktivität durch die entsprechenden Inhibitoren nicht mehr effizient bzw. gar nicht mehr gehemmt werden kann. Im Unterschied zu solchen Primärmutationen verursachen Sekundärmutationen bei alleinigem Auftreten noch keine Resistenz. Sie können aber die durch Primärmutationen bedingte Resistenz verstärken oder Replikationsdefizite ausgleichen (Miller, 2001 b).

Die fehlende Korrekturleseaktivität der zellulären RNA-Polymerase II sowie der HIV RT verursacht eine hohe Mutationsrate (Modrow, Falke, 1997). Dadurch entstehen ständig neue Quasispezies (Domingo et al., 1995), genetisch eng verwandte HIV-Genome, die sich nur durch wenige Mutationen voneinander unterscheiden.

Quasispezies mit resistenzverursachenden Mutationen können bereits bei therapienaiven Patienten nachgewiesen werden. Häufig haben sie jedoch einen so geringen Anteil an der gesamten HIV-Population, dass sie durch direkte Sequenzierung der HIV-RNA oder der proviralen DNA nicht detektiert werden können (Paolucci et al., 2001). In Abwesenheit antiviraler Therapeutika sind resistente Quasispezies gegenüber dem Wildtyp in der Regel benachteiligt und gehen durch Selektionsprozesse verloren. Durch eine Therapie mit den entsprechenden Virostatika haben HIV-Stämme mit resistenzverursachenden Mutationen einen Selektionsvorteil. Resistente Quasispezies können dann ihren Anteil an der Gesamtpopulation rasch vergrößern und zu einer klinisch manifesten Resistenz führen.

Zur Inzidenz der HIV-Resistenz gibt es unterschiedliche Angaben, sie hängt vom untersuchten Patientengut ab.

Nach Cozzi Lepri et al. (2000) lag der Anteil phänotypischer Resistenz gegen den verabreichten PI bei Patienten mit Wiederanstieg der Viruslast unter Therapie bei 45,1%. Ristig et al. (2002) fanden bei Patienten mit HIV-Primärinfektion in 17 % genotypische Resistenz.

A.5 Möglichkeiten der HIV-Resistenzmessung

A.5.1 Genotypische Resistenztests

Für genotypische Resistenzbestimmungen werden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze verwendet.

Bei auf Sequenzierung basierenden Tests wird die vollständige Sequenz der zu untersuchenden Genabschnitte, meist Protease und Reverse Transkriptase ermittelt. Durch Vergleich mit der Sequenz eines vollständig sensitiven WT-Isolates, werden alle Mutationen identifiziert, unabhängig davon ob es sich um bereits bekannte Resistenzmutationen handelt oder nicht.

Punkt-Mutations-Assays hingegen suchen gezielt nach Mutationen in bestimmten, für die Resistenzentwicklung wichtigen Positionen (Miller, 2001 a).

Es gibt umfangreiche Daten zur Bewertung von Mutationen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Resistenz des jeweiligen Enzyms. In diese Beurteilung fließen Informationen aus Zellkulturexperimenten mit entsprechend mutierten HIV-Stämmen, also phänotypische Resistenzdaten ein. Außerdem werden epidemiologische Daten, etwa die Häufigkeit der betreffenden Mutation in therapienaiven bzw. vortherapierten Patienten verwendet. Eine Vorhersage des Resistenzgrades bei komplexen Mutationsmustern eines individuellen Patienten ist oft schwierig und subjektiv. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung von Datenbanken nützlich, die die ständig wachsende Informationsmenge bezüglich Resistenzmutationen und deren Wechselwirkungen speichern und verarbeiten können. Teilweise sind diese Datenbanken frei im Internet verfügbar (z. B. <http://hiv-4.stanford.edu/cgi-bin/hivseqweb.pl>) oder sie dienen der spezifischen Auswertung kommerzieller genotypischer Testsysteme (D.1). Mit Hilfe entsprechender Software wird hier nach Eingabe der PR- bzw. RT-Sequenz das jeweilige genotypische Resistenzprofil erstellt. Dabei wird der Grad der Resistenz meist in verschiedenen Kategorien, z. B. sensitiv, intermediär- und hochresistent angegeben. Bezüglich der gesamten Interpretation gibt es keine festgelegten Kriterien zwischen den verschiedenen genotypischen Datenbanken, was eine unterschiedliche Einstufung von Mutationsmustern in Bezug auf ihren Resistenzgrad zur Folge haben kann (Hanna, D`Aquila, 2001; Department of Health and Human Services, 1998).

A.5.2 Phänotypische Resistenztests

Hier wird direkt die Wirkung von Inhibitoren auf die Replikation von HIV in Zellkultur oder die *in vitro* Aktivität isolierter HIV-Enzyme untersucht. Dabei werden meist IC₅₀ oder IC₉₀ bestimmt: Dies sind diejenigen Inhibitorkonzentrationen, bei denen die Virusreplikation bzw. die gemessene Enzymaktivität um 50 bzw. 90% gehemmt wird (Hirsch et al., 1998; Montaner et al., 2001). Die Resistenzfaktoren werden durch Division von IC₅₀ oder IC₉₀ aus Patientenmaterial durch die jeweiligen Werte eines Wildtyp-Referenzstammes erhalten (Garcia-Lerma et al., 2001; Demeter et al., 2001). Im Gegensatz zur genotypischen Resistenzbestimmung handelt es sich nicht um eine indirekte Dateninterpretation, die Resistenzfaktoren leiten sich unmittelbar aus Messergebnissen ab.

A.5.2.1 Phänotypische Resistenzmessung in Zellkultur

Zunächst wurden für die phänotypische Resistenzmessung in Zellkultur direkt Virusisolate aus Patientenmaterial verwendet. Die Virusreplikation wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der zu untersuchenden antiviralen Substanzen gemessen. Die quantitative Messung der Virusreplikation ist jedoch methodisch schwierig: Manche Isolate replizieren in Zellkultur nur langsam oder praktisch überhaupt nicht. Larder et al. verwendeten 1990 einen Plaque-Reduktionsassay, damit konnten nur syncytienbildende Stämme nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Virusreplikation durch Messung von Antigen in Zellkulturüberstand (Japour et al., 1993) erfasst einen größeren Anteil der HIV-Isolate, ist jedoch sehr aufwendig (Zeitbedarf ca. 6 Wochen).

Unabhängig von der Testauswertung ist die Virusisolierung aus Patientenmaterial schlecht standardisierbar. Da die betreffenden Isolate auch in Bezug auf andere Gene (z. B. Integrase) nicht isogen sind, können Unterschiede im Replikationsverhalten auch auf andere Faktoren als Resistenz gegen die im Test eingesetzten Inhibitoren zurückzuführen sein.

Aus diesen Gründen haben sich in den letzten Jahren Resistenztests mit rekombinanten HIV-Viren durchgesetzt. Diese Assays basieren auf PCR-Amplifikation der die PR und RT codierenden Gene aus Patientenmaterial. Die Amplifikate werden anschließend in HIV-1 Vektoren eingefügt, bei denen die betreffenden Gene deletiert wurden. Die entstehenden rekombinanten HIV-Isolate sind außerhalb dieser Regionen isogen. Sie werden in Zellkultur mit den zu untersuchenden Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, dabei werden ihre IC₅₀ bzw. IC₉₀ bestimmt. Um die Virusreplikation schneller, einfacher und quantitativ mess-

bar zu machen, wurden Indikatorgene wie Luziferase in die defizienten Vektoren eingefügt (Petropoulos et al., 2000).

Gegenwärtig werden zwei derartige Tests kommerziell angeboten: Antivirogram Assay (Virco, Mechelen, Belgien), sowie PhenoSense (Viro-Logic, San Francisco, USA). Sie unterscheiden sich in technischen Aspekten, wie der Art der Detektion der Virusreplikation. Ihr Preis liegt bei ca. 700-1000 \$ (Flexner, 2000).

A.5.2.2 Enzymatische phänotypische Resistenztests

Hierbei wird die *in vitro* Hemmbarkeit des Zielenzym (PR oder RT) durch die therapeutisch eingesetzten Inhibitoren untersucht.

Für die Reverse Transkriptase sind solche Assays bereits entwickelt worden (Garcia-Lerma et al., 1999; Vasquez-Rosales et al., 1999).

Zur Messung der RT-Aktivität wird die neu synthetisierte cDNA nach Inkubation mit einer definierten heterologen RNA quantifiziert. Durch Amplifikation der cDNA mittels PCR wird eine hohe Sensitivität erreicht. Die phänotypische Resistenz der RT aus Patientenmaterial wird bestimmt, indem die Reverse Transkription in Gegenwart der zu untersuchenden RTI durchgeführt wird (Garcia-Lerma et al., 1999). Wie bei den Zellkultur-basierten Assays wird für jeden Inhibitor IC_{50} bzw. IC_{90} und daraus die Resistenzfaktoren der Patienten RT bestimmt.

A.5.2.3 Analytische und klinisch relevante Grenzwerte („Cut-off“ Werte)

Die Interpretation der quantitativen Resistenzfaktoren wird durch Grenzwerte („Cut-off“) erleichtert. Bei über diesen Grenzwerten liegenden Resistenzfaktoren muss ein signifikanter Wirkungsverlust des jeweiligen Inhibitors angenommen werden. Dabei wird zwischen analytischen und klinisch relevanten Grenzwerten unterschieden.

Die **analytischen (technischen) Grenzwerte** werden von der Reproduzierbarkeit des gesamten phänotypischen Resistenztests bestimmt (Larder, 2001). Ihre Ermittlung erfolgt durch wiederholte Untersuchung des Wildtyps in voneinander unabhängigen Testdurchgängen ausgehend von der gleichen DNA als Template. Aus den Ergebnissen werden Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall der IC_{50} -Werte bestimmt. Der Grenzwert wird meist, wie bei anderen mikrobiologischen oder klinisch-chemischen Testverfahren, durch Mittelwert \pm 2x bzw. 3x Standardabweichung definiert. Außerhalb dieses Bereichs liegende Messwerte

gelten als signifikant vom WT abweichend. Analytische Grenzwerte sind nur begrenzt aussagekräftig bezüglich der klinischen Relevanz von Resistenzfaktoren. Informationen darüber können nur durch Korrelation der Testergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten erhalten werden. Die Bestimmung genauer, **klinisch relevanter Grenzwerte** ist dabei schwierig (Garcia-Lerma, Heneine, 2001).

A.5.3 Vergleich phänotypischer und genotypischer Resistenztests

Im Folgenden werden die beiden Konzepte der *in vitro* Resistenzbestimmung einander gegenübergestellt. Zur besseren Übersicht sind jeweils die wichtigsten Vor- und Nachteile in Tabelle A.1 zusammengefasst.

	Vorteile	Nachteile
Genotypische Resistenztests	Relativ schnell durchführbar, technischer Aufwand vergleichsweise gering; hohe Reproduzierbarkeit.	Resistenzdaten schwierig zu interpretieren, v. a. bei komplexen Mutationsmustern; Wechselwirkungen der verschiedenen Mutationen untereinander kann schlecht vorhergesagt werden; bei neuentwickelten Wirkstoffen kaum Mutations- und Resistenzdaten.
Phänotypische Resistenztests	Direkte, funktionelle Messung der Resistenz; Einfache Interpretation der Resistenzdaten, auch bei neuen Inhibitoren.	Testdurchführung aufwendig und teuer; Reproduzierbarkeit durch lange Testprozedur mit vielen Störgrößen geringer als bei genotypischen Assays.

Tab. A.1

Ein wichtiger Vorteil phänotypischer Resistenztests ist die Tatsache, dass Resistenzfaktoren hier direkt aus Messdaten ermittelt, also objektiv bestimmt werden. Dies bringt aber gleichzeitig das Problem der Interpretation der Messwerte und die Notwendigkeit der Bestimmung analytischer und möglichst auch klinischer Grenzwerte (A.5.2.3) mit sich.

Genotypische Resistenzdaten sind das Ergebnis einer komplexen Interpretation mit Bewertung der Auswirkung der einzelnen Mutationen und ihres Zusammenspiels auf die Resistenz.

Da es sich hier nicht um quantitative Messwerte handelt, sind keine „Cut-off“-Werte notwendig. Die Interpretation findet bereits bei der Bewertung der Mutationen statt. So werden genotypische Resistenzdaten meistens in Kategorien, wie z. B. empfindlich, intermediär resistent und resistent angegeben.

Phänotypische sind gegenüber genotypischen Resistenzbestimmungen insbesondere im Vorteil bei:

- Komplexen Mutationsmustern, da hier der Einfluss auf die Resistenz genotypisch schwer vorhergesagt werden kann. Dabei kann sowohl eine Verstärkung der Resistenz durch synergistische Wechselwirkung als auch eine Verminderung durch kompensierende Mutationen erfolgen.
- Untersuchung neuer Inhibitoren, für die erst wenige oder keine genotypische Resistenzdaten verfügbar sind.

A.5.4 Indikationen für die Bestimmung der HIV-Resistenz

Die Indikationen für *in vitro* Resistenzbestimmung sind ständig im Fluss. Gegenwärtig werden von der „EuroGuidelines Group for HIV Resistance“ Resistenzbestimmungen in folgenden klinischen Situationen empfohlen:

Versagen der antiretroviralen Therapie

Die diagnostische Wertigkeit von Resistenztests ist hier am besten abgesichert. Therapieversagen ist keineswegs immer durch Resistenz gegen die jeweiligen Therapeutika verursacht, sondern auch durch schlechte Compliance oder pharmakokinetische Faktoren. Resistenzbestimmungen helfen, vor einer notwendig gewordenen Therapieumstellung antiretrovirale Substanzen mit reduzierter bzw. aufgehobener Wirksamkeit zu identifizieren und sie im neuen Therapieschema zu vermeiden.

HIV-Infektion in der Schwangerschaft

Eine hochwirksame Pharmakotherapie trägt dazu bei, das Risiko einer Infektion des Kindes zu verringern. Fiscus et al. (1999) berichten von einer Verringerung des Risikos einer vertikalen Übertragung auf bis zu 3,1%. Resistenzbestimmung gewährleistet eine möglichst wirksame Pharmakotherapie mit effizienter Senkung der Viruslast. In der Schwangerschaft müssen resistenzbehaftete Virostatika rasch identifiziert und abgesetzt werden, da Nebenwirkungen einer Pharmakotherapie hier besonders schwer sein können. Resistenzbestimmung wird au-

ßerdem bei HIV-infizierten Kindern von Müttern mit nachweisbarer Viruslast unter Therapie empfohlen.

Akute HIV-Infektion vor Therapiebeginn

Ermittlung der Resistenz ist insbesondere wichtig bei erhöhter Wahrscheinlichkeit der Infektion mit resistenten HIV-Stämmen. Es wird jedoch empfohlen, sofort mit einer antiretroviralen Therapie zu beginnen und sie nach Vorliegen der Resistenzdaten diesen anzupassen. Durch einen möglichst frühen Therapiebeginn hofft man, die T-Zell Funktion des Patienten besser aufrecht erhalten zu können (Hanna, D`Aquila, 2001).

Bereits länger bestehende Infektion vor Therapiebeginn

Auch hier sind Resistenztests vor allem bei erhöhtem Risiko indiziert, z. B. bei bekannter oder vermuteter Resistenz der Infektionsquelle.

Der Resistenznachweis ist jedoch häufig schwierig, da resistente HIV-Populationen ohne Selektionsdruck rasch von „fitteren“ WT-Stämmen verdrängt werden. Resistente Quasispezies werden aber häufig nicht vollständig eliminiert, sondern persistieren in Geweben mit geringer Virusproduktion. Häufig sind sie wegen ihres sehr geringen Anteils an der Gesamtpopulation kaum zu erfassen. Ein wichtiger Aspekt neben der Eingrenzung der Ursache einer bereits klinisch manifest gewordenen Resistenz ist ihre Diagnose, bevor sie zu einem Therapieversagen geführt hat. Petropoulos et al. (1999) berichten über die Detektion phänotypischer Resistenz vor Anstieg der Viruslast bei Therapieversagen.

Postexpositionsprophylaxe

Die Postexpositionsprophylaxe (PEP) kann das Risiko einer HIV-Infektion nach erfolgter Exposition signifikant verringern. Die PEP soll unverzüglich begonnen und modifiziert werden, falls Resistenzdaten rechtzeitig verfügbar sind.

A.6 Hintergrund des Projektes

Im Unterschied zu bereits entwickelten Enzymtests für die RT (A.3.2.2) existiert derzeit noch kein Assay für die enzymkinetische phänotypische Resistenzbestimmung der HIV PR aus Patientenmaterial (Garcia-Lerma and Heneine, 2001). Eine wesentliche Erleichterung bei der Entwicklung von enzymatischen RT-Assays ist die Tatsache, dass cDNA als Produkt der enzymatischen Reaktion durch PCR amplifiziert und damit sehr sensitiv nachgewiesen werden kann. Die Aktivität im Plasma vorliegender RT kann somit direkt gemessen und zur Ermitt-

lung phänotypischer Resistenz verwendet werden (Heneine et al., 1995; Garcia-Lerma, 1999). Die Produkte der durch die Protease katalysierten Reaktionen sind als Oligopeptide dagegen nicht amplifizierbar. Das Enzym kann daher nicht direkt in Patientenmaterial detektiert werden, sondern muss zunächst in ausreichender Menge hergestellt werden. Dies kann zum einen durch Amplifikation des PR-Gens mittels PCR und anschließender rekombinanter Expression in verschiedenen Zellkultursystemen erfolgen. Ein alternatives Verfahren ist die zellfreie *in vitro* Transkription/Translation (D.4.2).

Ausreichende Mengen HIV PR für enzymatische Untersuchungen wurden in der Vergangenheit durch rekombinante Expression in *E. coli* gewonnen. Dabei wurde sowohl Wildtyp-PR als auch solche mit definierten Resistenzmutationen exprimiert und enzymkinetisch untersucht (Ermolieff et al., 1997; Maschera et al., 1995).

Zur Auswertung peptidolytischer Proteaseassays wurden unter anderem chromatographische, kolorimetrische (Absorptionsmessung) und fluorometrische Verfahren eingesetzt. Eine kontinuierliche Registrierung der Enzymaktivität ist bei Absorptions- und Fluoreszenzmessungen möglich, da die Absorption bzw. das emittierte Signal der Menge des gespaltenen Substrates proportional ist. Mit chromatographischen Verfahren wird der Anteil gespaltenen Substrates zu bestimmten Zeitpunkten gemessen, die Enzymaktivität kann nicht kontinuierlich registriert werden.

Eine Erhöhung des Probendurchsatzes im Mikrotiterplattenformat ist prinzipiell für kolorimetrische und fluorometrische Assays möglich. Die Sensitivität ist bei Verwendung kolorimetrischer Substrate geringer. So benötigten Debbins et al. (1997) 200-300 nM HIV PR im Assay und konnten deshalb nur Inhibitoren mit hoher Dissoziationskonstante (K_i) des Enzym-Inhibitor-Komplexes unter Gleichgewichtsbedingungen (B.12) untersuchen. Die Verwendung eines Fluoreszenzsubstrates erlaubte Maschera et al. (1995), die PR-Konzentrationen auf 1,5-20 nM zu reduzieren und K_i der therapeutisch eingesetzten PI zu bestimmen.

Die bisher entwickelten Assays zur enzymatischen Untersuchung der HIV PR dienten meist der phänotypischen Charakterisierung von Resistenzmutationen oder zum Screening neuer PI. Dabei wurden als Ausgangsmaterial meist HIV-Isolate mit definierten Mutationen aus Zellkultur verwendet. Keines der bisher entwickelten Verfahren war für die Untersuchung von aus Patientenmaterial exprimierten HIV Proteinase ausgelegt. Demnach war es bisher nicht möglich, Proteaseassays zur phänotypischen Resistenzbestimmung bei Patienten unter anti-retroviraler Therapie einzusetzen.

A.7 Aufgabenstellung

Am Max von Pettenkofer-Institut war bereits ein Expressionssystem für die HIV-1 PR in *E. coli* (von der Helm et al., 1994) sowie ein Proteaseassay mittels RPC (reversed phased chromatography) etabliert worden. Dieser Ansatz wurde zu einem Verfahren für die von Patientenmaterial ausgehende rekombinante Expression der HIV-1 PR in *E. coli* und anschließende *in vitro* Resistenzbestimmung weiterentwickelt (Gehring, 2001). Dabei wurde gezeigt, dass durch das verwendete Expressionssystem HIV PR mit unterschiedlichen Resistenzprofilen in ausreichender Menge hergestellt werden konnte.

Durch Messung der prozentuellen Spaltung eines Substrates bei unterschiedlichen PI-Konzentrationen wurden mittels RPC IC_{50} Werte bestimmt. Dabei wurde für die Untersuchung einer HIV PR pro getestetem PI ca. 3 h benötigt.

Die RPC-Auswertung ist damit für den Einsatz in der Routinediagnostik zu zeitaufwendig, sie erlaubt zudem keine enzymkinetischen, sondern nur Ein-Punkt-Messungen mit entsprechend großer Messungenaugigkeit.

Sowohl die Sensitivität als auch den Probendurchsatz betreffend schien ein Fluoreszenzmessverfahren der geeignetste Ansatz zur Lösung dieser Problematik. Zudem erlaubt eine online Fluoreszenzmessung die kontinuierliche Bestimmung der Proteaseaktivität während des gesamten Messzeitraums mit enzymkinetischer Auswertung (A.6). Die Etablierung eines solchen fluorometrischen Peptidassays zur enzymatischen Bestimmung der PR Resistenz ist das Hauptthema vorliegender Arbeit.

Dabei wurden vorangig folgende Aspekte und Fragestellungen bearbeitet:

- Etablierung der Versuchsbedingungen für einen Fluoreszenzassay im Küvettenformat
- Entwicklung eines Verfahrens zur enzymkinetischen Auswertung der Fluoreszenzmessungen
- Enzymatische Charakterisierung der WT PR sowie ausgewählter PR aus Patientenmaterial durch K_m -Bestimmung und Titration des aktiven Zentrums
- Messung des WT und ausgesuchter aus Patientenproben exprimierten PR im Küvettenformat; Vergleich der Resistenzdaten mit Ergebnissen der RPC-Auswertung und den jeweiligen genotypischen Resistenzprofilen
- Transfer des Fluoreszenztests in Mikrotiterplattenformat zur Erhöhung des Probendurchsatzes

- Wahl des geeignetsten Gerätes zur Fluoreszenzmessung bezüglich Sensitivität, Auswert-Software, Messgeschwindigkeit und Anschaffungspreis sowie Etablierung des Verfahrens im optimierten System

B Material und Methoden

B.1 Geräte und Software

Brutschrank B 10	Memmert, Schwabach
Agaroseelektrophoresekammern incl. Zubehör	bts, St. Leon-Rot
Proteinelektrophoresekammern incl. Zubehör	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Elektroporationsgerät Gene pulser II	Biorad, München
Geldokumentationsgerät E.A.S.Y. Win 32	Herolab, Wiesloch
Geltrocknungsrahmen 24x24 cm	Roth, Karlsruhe
HPLC-Anlage ÄKTA explorer incl. Software	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Rotixa/KS	Hettich, Tuttlingen
Küvettenfluorometer SM25	Biotek Kontron, Neufahrn
Magnetrührer Ikamag Reo	Ika Labortechnik, Staufen
Mikrotiterplattenlesegeräte HTS 7000	Perkin Elmer, Weiterstadt
Fluoroscan Ascent FL	Labsystems, Frankfurt/Main
F1 600	Biotek Kontron, Neufahrn
Mikrowellengerät Micro-Chef FM B 930	Moulinex, Solingen
PCR-Gerät UNO II Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH- Meter ph 526	Bachofer, Reutlingen
Pipetten Gilson Pipetman	Abimed, Langenfeld
Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
SLG, autoklavierbar	Süd-Laborbedarf, Gauting
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Power Supply GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Power Supply Power Pack 200	Biorad, München
Sequenziergerät ABI PRISM 377A incl. Software	Perkin Elmer, Weiterstadt
Spektralfluorometer SFM25	Biotek Kontron, Neufahrn
Spektralfluorometer Fluoro Max	Spex Industries, Edison, New Jersey, USA

Sterilbank Laminar Flow BDK		Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Thermostat K20		Haake, Karlsruhe
Thermostat RM6		Lauda, Königshofen
Tischzentrifugen	Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5415	Bachofer, Reutlingen
	Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
Ultraschallgerät Branson Sonifier B-15		Bachofer, Reutlingen
Schüttelgerät Vortex-2-Genie		Bachofer, Reutlingen

Software

	<i>Verwendungszweck</i>	<i>Quelle</i>
Flucol	Steuerung von SM25	Labor Prof. Machleidt, LMU München
Flukin49	Auswertung der SM25 Messungen	Labor Prof. Machleidt, LMU München
FigureP	Enzymkinetische Auswertung der Messergebnisse	Biosoft, Cambridge, GB

B.2 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Konzentrator Centricon		Amicon, Witten
Eppendorf Gefäße 1,5 und 2 ml		Eppendorf, Hamburg
Küvetten ½ Mikro PMMA		Mueller Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
Küvetten für Elektrottransformation „Gene Pulser Cuvette“		Biorad, München
Mikrotiterplatten		
	Fluoro-Nunc	Nunc, Wiesbaden
	FIA-Platte, schwarz	Greiner, Frickenhausen
	96 Well Black/ Clear Bottom Plate	Corning GmbH, Wiesbaden
„PCR tubes“		Perkin Elmer Deutschland, Überlingen
Pipettenspitzen 10 µl		Biozym, Hessisch Oldendorf
	20-200 µl	Sarstedt, Nürnberg
	1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen gestopft, 10, 100, 1000 µl		Biozym, Hessisch Oldendorf

B.3 Chemikalien

Andere als die nachfolgend angeführten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe „z.A.“ von folgenden Firmen bezogen: Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, Deisenhofen. Wässrige Lösungen wurden mit gereinigtem Wasser der Reinstwasseranlage der Fa. Memtech, Morenweis hergestellt.

Für molekularbiologische und andere Reaktionsansätze mit großem Reinheitsanspruch wurde steriles, bidestilliertes Wasser „Ampuwa“ der Firma Fresenius, Bad Homburg, verwendet. Konzentrationen werden in der Regel als Volumenprozent (v/v) angegeben.

Agarose Seakem LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz	Biomol, Hamburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Dithiothreitol	Biomol, Hamburg
PCR-Nukleotid-Mix	Roche, Mannheim
10 x PCR-Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt
„Big Dye“	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tryptone Peptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA

B.3.1 Enzyme

AmpliTaqGold-Polymerase	5 U/ μ l	Perkin Elmer, Weiterstadt
Benzonase	25 U/ μ l	Merck, Darmstadt
Lysozym	20 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Restriktionsenzyme mit zugehörigem Puffer B	40 U/ μ l	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	1 U/ μ l	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	1 U/ μ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

B.3.2 Substrate für die HIV Protease

(Bachem, Heidelberg)

Fluoreszenzsubstrat: DABCYL-?-Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS

Proteasesubstrat III: H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-p-nitro-Phe-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂

B.3.3 Inhibitoren der HIV Protease

<i>Wirkstoff</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Amprenavir	Agenerase	Glaxo Wellcome, Greenford, GB
Lopinavir in Kombination mit Ritonavir	Kaletra	Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA
Indinavir	Crixivan	Merck Research Laboratories, Rahway NJ, USA
Nelfinavir	Viracept	Agouron Pharmaceuticals Inc., La Jolla, CA, USA
Ritonavir	Norvir	Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA
Saquinavir	Invirase/Fortovase	Roche Products LTD., Welwyn Garden City, GB

B.3.4 DNA- und Protein-Größenstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BenchMark™ Protein Ladder Mix	Gibco BRL, Eggenstein
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	Gibco BRL, Eggenstein

B.3.5 Kits zur DNA-Extraktion

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
NucleoSpin Blood Kit	Extraktion genomischer DNA aus Vollblut	Macherey und Nagel, Düren
Nucleobond PC 100	Präparation von Plasmid-DNA	Macherey und Nagel, Düren
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Extraktion viraler Nukleinsäuren	Roche, Mannheim
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Extraktion von PCR-Produkt aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden

B.3.6 Farbstoffe

2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3', 3'', 5', 5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein (Bromphenolblau)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Westernblot Chromogen-/Substratlösung	Biosens, Oberhaching

B.3.7 HIV-Isolate

Wildtyp HIV BRU; Wain-Hobson et al. (1985)
MvP-899 Wildtyp; Eberle et al. (1995)
Roche-Mutante 899; Eberle et al. (1995)

B.3.8 Expressionsvektor

PBD2 Expressionsvektor (Bröker et al., 1986)

B.3.9 Oligonukleotide

P3D2, P4M	Roth, Karlsruhe
Geno1, Geno2	Applied Biosystems, Weiterstadt

B.3.10 Elektroporationskompetente *E. coli*-Zellen

TG1	Stratagene, Heidelberg
-----	------------------------

B.3.11 Antikörper

Anti-HIV Protease, Kaninchen	Eurogentec, Herstell, Belgien
Anti-Kaninchen IgG, aP markiert	Dianova, Hamburg

B.4 Lösungen, Puffer und Medien

Agarosegelmatrix:	Agarose in gewünschter Konzentration in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen lösen	
Ammoniakalk. Silbernitratlösung:	15% v/v 17,7 mM 0,44% v/v	Ethanol NaOH NH ₄ OH
auf 100 ml mit Ampuwa-H ₂ O auffüllen 0,9 g AgNO ₃ in 4 ml Ampuwa-H ₂ O lösen und langsam zu obiger Lösung tropfen.		
Anodenpuffer:	32 mM pH 8,9 mit konz. HCl einstellen	Tris
2x Assay Puffer:	100 mM 2 mM 5 mM 2 M 5% v/v pH mit HCl auf 4,7 einstellen	NaAc EDTA DTT NaCl Glycerin
Entfärbelösung für silbergefärbte Gele:	10% v/v 5% v/v	Ethanol Essigsäure
Entwickler für Silberfärbung:	106 mM 0,015% v/v	Na ₂ CO ₃ Formaldehyd
Fixierlösung für Silberfärbung:	1% v/v 0,2 M	Glutaraldehyd NaHCO ₃
„Gelfixer“ für Silberfärbung:	50% v/v 10% v/v	Methanol Essigsäure
Gelpuffer:	30 mM 0,1 mM	Tris SDS

Geltrocknungslösung:	20% v/v	Ethanol
	10% v/v	Glycerin

NaAc- Lösungen für Aufarbeitung der Protease

Lösung 1:	50 mM	NaAc pH 5,5
	5 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	15% v/v	Glycerin

Lösung 2:	0,5 M	NaAc pH 5,5
	5 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	15% v/v	Glycerin

6x „Loading Dye“:	60 mM	EDTA
	60% v/v	Glycerin
	0,2%	Bromphenolblau

PBS-Puffer:	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	pH mit HCl auf 7,4 einstellen	

4x SEB für SDS-PAGE:	9% v/v	Glycerin
	7,3% v/v	SDS
	2,6 M	β-Mercaptoethanol
	0,02%	Bromphenolblau

TAE- Puffer:	0,04 M	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA

Towbin Transfer Puffer:	30,3 g	Tris
	144,1 g	Glycin
	10 g	SDS
	mit Aqua bidest. auf 10 l auffüllen.	

B.4.1 Medien

LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	evtl. 15 g/l	Bacto-Agar (für Platten)
	bei Bedarf 100 µg/ml	Ampicillin
SOB-Medium	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	autoklavieren	
	+ 10 ml	1 M MgCl ₂
	+ 10 ml	1 M MgSO ₄
SOC-Medium:	20 mM	Glucose
	in SOB-Medium gelöst	

B.5 Molekularbiologische Methoden

B.5.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden 2 ml einer Übernachtskultur transformierter *E. coli*-Zellen verwendet und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Nukleobond AX PC 100 Kits (Macherey und Nagel, Düren) nach der Anleitung des Herstellers isoliert. Das Vorgehen entspricht weitgehend der von Birnboim et al. (1979) beschriebenen Methode:

Nach Lyse der Bakterienzellen wird die chromosomale und Plasmid-DNA in einer NaOH/SDS-Lösung denaturiert. Im folgenden Schritt wird die chromosomale DNA durch KAc gefällt, während die Plasmid-DNA bei 5 min Inkubationszeit in Lösung bleibt. Diese wird an eine Anionenaustauschersäule mit Silicamatrix adsorbiert, gewaschen und anschließend eluiert.

B.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuresuspensionen durch photometrische Messung erfolgte in Quarzküvetten bei 260 und 280 nm. Bei 1 cm Schichtdicke entspricht der

Absorptionswert $OD_{260nm} = 1$ einer DNA Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure. Bei reinen Proben liegt er zwischen 1,6 und 2,0 bei Verunreinigungen mit Proteinen oft darunter, durch RNA-Beimengungen in der Regel darüber (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989).

Eine Abschätzung der DNA-Menge wurde mit Hilfe eines Markers auf einem Agarosegel vorgenommen. Dabei wurde die Intensität der abzuschätzenden Bande unter UV-Licht mit einer Bande des DNA Markers verglichen. Beide Banden müssen ähnliche Größen aufweisen, weil die Menge an eingelagertem Ethidiumbromid und somit die Signalstärke von der Größe der DNA Moleküle abhängt.

B.5.3 Extraktion der proviralen HIV-1 DNA aus Leukozyten

Bei Verwendung des „High pure viral nucleic acid kit“ (Roche, Mannheim) wurde die provirale DNA aus 200 μl EDTA-Blut gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert.

Größere Mengen DNA wurden aus 1000 μl Vollblut mit Hilfe des „QIamp Blood Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) der Anleitung des Herstellers folgend, extrahiert.

Beide Kits arbeiten nach der gleichen Methode: Die Lymphozyten werden zunächst durch Proteinase K lysiert. Nach Zugabe von Isopropanol bzw. absolutem Ethanol wird die DNA an eine Säule adsorbiert, mehrfach gewaschen und mit Elutionspuffer von der Säule eluiert.

B.5.4 Amplifikation des HIV PR Gens mittels „single“ PCR

Da das HIV-Genom, einschließlich der Protease im Patientenmaterial meist in relativ geringer Menge vorkommt, wurde es durch PCR spezifisch amplifiziert.

Der PCR-Ansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

<i>Zugegebenes Volumen/Menge</i>	<i>Komponente (Konz. der Stammlösung)</i>	<i>Konzentration im PCR-Ansatz</i>
400 ng (auf Gel abgeschätzt)	DNA	8 ng/ μl
2 μl	Primer P3 (10 pmol/ μl)	0,25 μM
2 μl	Primer P4 (10 pmol/ μl)	0,25 μM
1,25 μl	dNTPs (10 mM)	0,25 mM
6 μl	MgCl ₂ (25 mM)	3 mM
5 μl	10 x PCR-Puffer II (ohne MgCl ₂)	
0,3 μl	AmpliTaQGold-Polymerase (5 U/ μl)	

<u>33,45 µl</u>	Ampuwa-H ₂ O
50 µl	Gesamtvolumen

Als Reaktionsgefäße dienten 0,2 ml PCR-tubes der Firma Perkin Elmer, Weiterstadt.

Die PCR wurde im UNO II Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter Verwendung folgenden Programms durchgeführt:

<i>Schritt</i>	<i>Vorgang</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>
1	Denaturierung der DNA, Aktivierung der Taq Gold Polymerase	95	12 min
2	Denaturierung der DNA	95	30 s
3	Anlagerung der Primer	48	45 s
4	Polymerisation	72	60 s
5	Vervollständigung der Extension	72	7 min
6	Kühlen des Ansatzes zur Verhinderung weiterer Reaktionen	4	unbegrenzt

Schritte 1, 5 und 6: 1 Zyklus

Schritte 2, 3 und 4: 55 Zyklen

B.5.5 Extraktion der RNA und PCR im Rahmen der Virusdiagnostik

Im Zuge der Weiterentwicklung des phänotypischen Resistenztests wurde diese PCR der in der Virusdiagnostik für die genotypische Resistenzbestimmung verwendeten „nested PCR“ angeglichen. Die Amplifikation erfolgte meist ausgehend von HIV-RNA, die aus EDTA-Plasma extrahiert wurde. Nach reverser Transkription wurde die 1. PCR gemeinsam für beide Resistenztests mit folgenden Primern durchgeführt:

Geno1: GCG TGT TGG AAA TGT GGR AAR GA 5'- Primer

Geno2: TTA CAT CAT TAG TGT GGG CAS 3'- Primer

Die Amplifikation mit dem „Expand long template PCR System“ (Roche, Mannheim) fand unter folgenden Bedingungen statt: : 2,5 U Enzymmix, 1,75 mM MgCl₂, 0,35 mM dNTP, Anlagerungstemperatur 50°C, 35 Zyklen.

Für die 2. PCR mussten Primer verwendet werden, die die Expression enzymatisch aktiver Protease erlauben. Dies ist nach Erfahrung der eigenen Arbeitsgruppe nur gewährleistet, wenn das synthetisierte Protein nicht mehr als 2 bis 3 Aminosäuren über den C-Terminus der HIV PR hinausgeht.

Die verwendeten Primer waren:

P3D2: CGG GGA TCC TTC AGA GCA GAC CAG AG 5'- Primer

P4M: GCC AAG CTT TCA AAA ATT TAA AGT GCA ACC AAT 3'- Primer

Amplifikationsbedingungen: 1,5 U AmpliTaq Gold Polymerase, 3 mM MgCl₂, 0,20 mM dNTP, Anlagerungstemperatur 48°C, 40 Zyklen.

B.5.6 Ermittlung der Sequenz des HIV PR-Gens

Die Sequenz des HIV Proteasegens wurde aus aufgereinigtem Amplikon bestimmt. Hierfür kam eine Modifikation der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Didesoxinukleotid-Methode zur Anwendung. Es wurde jeweils eine Sequenz-Reaktion mit Primer P3 bzw. P4 in folgendem Ansatz durchgeführt:

8 µl	„Big Dye“
100 - 200 ng	aufgereinigtes PCR Produkt
1µl	Primer P3 bzw. P4 (10 pmol/µl)
<u>x µl</u>	Ampuwa-H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Bedingungen für die Taq Cycle-Sequenzierung:

<i>Schritt</i>	<i>Vorgang</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>
1	Denaturierung der DNA	96	30 s
2	Anlagerung der Primer	55	10 s
3	Polymerisation	60	4 min
4	Kühlung des Ansatzes zur Verhinderung weiterer Reaktionen	4	unbegrenzt

Schritte 1-3: 25 Zyklen

B.5.7 Restriktion der HIV Protease Amplifikate

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an für sie spezifischen Sequenzen (Schnittstellen).

Demnach werden bei einer Restriktion Fragmente mit definierten Endsequenzen erzeugt. Wird ein Vektor mit demselben Restriktionsenzym behandelt, entstehen gleiche bzw. komplementäre DNA-Termini, eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation (B. 5.8).

Das spezifische PCR Produkt wurde, wie unter B.5.10 beschrieben, durch Agarosegelelektrophorese von eventuell vorhandenen Verunreinigungen getrennt. Von den nach Extraktion anfallenden 45 µl Eluat wurden im Normalfall 35 µl in folgendem Ansatz geschnitten, um passende DNA-Termini für die Ligation zu erhalten:

35 µl	eluiertes Amplikon
5 µl	10 x Puffer B
0,25 µl	BamHI (40 U/µl)
0,25 µl	HindIII (40 U/µl)
<u>9,5 µl</u>	Ampuwa-H ₂ O
50 µl	Gesamtvolumen

Die Restriktion wurde für 2 h bei 37°C im Brutschrank durchgeführt, die restringierten Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des „Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Von der so erhaltenen DNA-Lösung wurden 5 µl einer Agarosegelelektrophorese unterworfen, um die Gesamtmenge an restringiertem Amplikon abzuschätzen.

B.5.8 Ligation

Um eine effiziente Elektrotransformation zu gewährleisten, muss das zu transformierende Gen in einem zirkulären Plasmid vorliegen. Das restringierte Amplikon wurde deshalb in den ebenfalls mit BamHI und HindIII behandelten Vektor pBD2 ligiert. Die Reaktion wurde in einem möglichst kleinen Volumen durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit der Ligation von Vektor und zu inserierendem Fragment zu erhöhen.

Folgender Ansatz wurde bei ca. 10°C über Nacht inkubiert:

50 ng	mit BamHI und HindIII geschnittener Vektor pBD2
50 ng	mit BamHI und HindIII geschnittenes Amplikon
1/10 U	T4 DNA-Ligase
1 µl	10x Ligationspuffer
<u>x µl</u>	Ampuwa-H ₂ O
10 µl	Gesamtvolumen

B.5.9 Aufreinigung des Ligationsproduktes für die Elektrotransformation

Nachfolgende Schritte haben den Zweck, Ionen zu entfernen, da sie die Elektrotransformation stören. Zunächst wurde das Ligationsprodukt mit Ampuwa-H₂O auf 100 µl aufgefüllt, zur Erleichterung der Fällungsreaktion (Kopräzipitation) diente 1 µl Hefe-RNA. Nach Zugabe von 300 µl absolutem Ethanol sowie 1/10 Vol 3 M NaAc pH 5,2 wurde die DNA bei ca. – 20°C für 30 min gefällt. Es erfolgten zwei Waschschrirte mit 300 und 200 µl 70 % Ethanol, schließlich wurde das Ligationsprodukt in 20 µl Ampuwa-H₂O aufgenommen.

B.5.10 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen durch Anlegen elektrischer Spannung. Kleine Moleküle durchdringen die dreidimensionale Struktur des polymerisierten Gels leichter und laufen somit schneller und weiter als größere Moleküle.

Im Normalfall wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,4% verwendet. Zu ihrer Herstellung wurde zunächst die Agarose in 1x TAE kurz aufgekocht, um sie vollständig zu lösen.

Anschließend wurde das Gel in 50 bzw. 200 ml Elektrophoreseschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Gelkammer gesetzt und 1x TAE bis zur vollständigen Bedeckung des Gels zugegeben. Dem TAE-Puffer wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA-Banden unter UV-Bestrahlung sichtbar zu machen. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelixstruktur der DNA und fluoresziert in diesem Zustand bei Anregung mit UV-Licht.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 6x „loading dye“ versetzt und in die Taschen pipettiert. Schließlich wurde die Elektrophorese je nach Größe der Gelkammern mit 50 bzw. 80–90 V durchgeführt.

Die 200 ml Gele dienen zur Trennung von DNA einer bestimmten Größe (z. B. PCR-Produkt) von anderen DNA-Banden. Zu diesem Zweck wurde die betreffende Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die daraus DNA mit Hilfe des „Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) der Anleitung des Herstellers folgend isoliert.

B.6 Mikrobiologische Methoden

B.6.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Einem modifizierten Protokoll von Dower et al. (1988) folgend, wurde vom jeweiligen Stamm eine Einzelkolonie oder 100 µl Glycerinkultur als Übernachtskultur bei 37°C und 225 rpm unter Schütteln angezogen. Die Übernachtskultur wurde am darauffolgenden Tag 1:50 in LB-Medium überimpft und ebenfalls bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bis bei 590 nm eine OD von 0,5-1,0 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur jeweils 10 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. In den darauffolgenden 3 Schritten wurden die Zellen mit 250, 150 und 50 ml kaltem, bidestilliertem Wasser sowie mit 15 ml kalter, 10%-iger Glycerinlösung gewaschen und bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kalter, 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert, und 150 µl-Aliquots sofort in einer Aceton/Trockeneismischung eingefroren. Bei ca. -70°C gelagert, konnten die elektrokompetenten Zellen mehrere Monate ohne Qualitätseinbuße verwendet werden.

B.6.2 Elektrotransformation

Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und jeweils 40 µl mit ca. 5 ng Ligationsprodukt bzw. Plasmid versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in „Gene Pulser Küvetten“ (Biorad, München) überführt. Die Transformation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV und 25 µF Kondensatorkapazität im „Gene Pulser Apparat II“ (Biorad, München). Sofort nach dem Stromstoß wurden 950 µl SOC-Medium zugesetzt, die phänotypische Expression erfolgte bei 37°C und 225 rpm für eine Stunde. Zur Überprüfung der Transformation wurden eine Ampicillin enthaltende (0,1 mg/ml) Agarplatte mit 100 µl des Ansatzes beimpft, der Rest wurde über Nacht in 9 ml LB/Ampicillin-Medium kultiviert.

B.6.3 Rekombinante Expression der HIV-1 Protease

Die folgenden Schritte wurden im Inkubationsschüttler Innova 4000 (New Brunswick, Nürtingen) bei 37°C und 225 rpm durchgeführt:

Zunächst wurde die Übernachtskultur des Transformationsansatzes in 500 ml LB/Ampicillin-Medium bis zu einer OD_{600 nm} von etwa 0,5 angezogen. Nun erfolgte die Induktion des

lac-Promotors nach Zugabe von 0,2 % Lactose (Endkonzentration) für einen Zeitraum von 2,5 h. Die Kultur wurde anschließend bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei ca. -20°C gelagert.

B.7 Proteinchemische Methoden

B.7.1 Gewinnung der rekombinant exprimierten Protease

Zur Auflösung der Zellwände wurden die transformierten *E. coli*-Zellen aus B.6.3 zunächst in 30 ml PBS, 0,2% Tween resuspendiert und nach Zugabe von 1 U/ml Benzonase und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lysozym 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 5 mal in 25 ml PBS, 0,2% Tween aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und 10 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit Ul-traschall in 10 ml Lösung 1 resuspendiert, der pH mit 1 M HCl auf 2,0 eingestellt und die Suspension 30 min auf Eis gerührt. Dabei löst sich ein Teil der HIV PR, während der Großteil anderer Proteine aufgrund des niedrigen pH ungelöst bleibt, oder denaturiert und ausfällt. Durch die anschließende Zentrifugation wurden diese abgetrennt, zum Überstand wurde 1 Vol. Lösung 2 zugegeben und 30 min auf Eis gerührt. In diesem Schritt geht die Protease in die enzymatisch aktive dimere Form über. Zur Fällung des Enzyms wurde die Lösung langsam und unter Rühren auf Eis mit Ammoniumsulfat bis zu 50% Sättigung versetzt und 2-3 h oder über Nacht bei $2-8^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zentrifugation der gefällten Protease wurde diese in 300-500 μl 1x Assay Puffer, 10% DMSO durch 30-minütige Inkubation auf Eis unter mehrfachem gründlichen Durchmischen gelöst. Durch 2-minütige Zentrifugation bei 4°C wurden eventuell vorhandene unlösliche Bestandteile abgetrennt. Dann wurde die Lösung mit ca. 300 μl Assay Puffer, 10% DMSO versetzt, unter Rühren auf Eis eluiert und anschließend nochmals bei 4°C für 2 min zentrifugiert. Die so erhaltene PR-Lösung konnte direkt oder in entsprechender Verdünnung in 1x Assay Puffer, 10% DMSO für die Fluoreszenz- oder HPLC-basierte Aktivitätsmessung verwendet werden. In einzelnen Fällen wurde exemplarisch eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Menge an exprimierter HIV PR abschätzen zu können.

B.7.2 Anreicherung der WT Protease

Für die Etablierung des Fluoreszenztests wurde eine ausreichend große Menge angereicherter WT PR benötigt. Hierzu wurde die in Assay Puffer aufgenommene Protease aus 5 Aufarbeitungen in einem Ansatz vereinigt und bei 4°C zentrifugiert. Der 1. Überstand wurde abgetrennt und verworfen, da hier neben einem Teil der Protease auch viele andere leichtlösliche Proteine enthalten waren. Das Sediment wurde erneut mit 1x Assay Puffer versetzt, 3-4 h auf Eis gerührt und für 2 min bei 4°C bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt, die Überstände wurden anschließend vereinigt und das Volumen mit Hilfe von Centriprep-10 Concentrator (Amicon, Beverly, USA) eingeeengt. Im vorliegenden Fall hatte der Einwegkonzentrator einen „Cut-off“ von 10 kD, d.h. der verwendete Filter war für Moleküle mit einer Masse <10 kD durchlässig. Kleinere Proteine und Peptide sowie Salze und Wasser werden durch Zentrifugation von der zurückbleibenden Proteaselösung getrennt. Diese wird demzufolge mit zunehmender Zentrifugationsdauer immer stärker konzentriert und gereinigt. Die angereicherte PR-Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Dies garantierte, dass während der Etablierung des Fluoreszenzassay HIV PR mit gleichbleibenden und für das Expressionssystem repräsentativen Eigenschaften zur Verfügung stand.

Die Schritte B.7.3 bis B.7.6 wurden nicht routinemäßig innerhalb des Resistenztests durchgeführt. Sie dienten zum Nachweis und zur quantitativen Abschätzung der HIV PR. Im Unterschied zum Fluoreszenztest wird die Protease hier unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität und Löslichkeit nachgewiesen.

B.7.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Um bei der SDS-PAGE (B.7.4) die Geltaschen mit vergleichbaren Gesamtproteinmengen zu beladen, wurde die Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben bestimmt. Dies geschah durch photometrische Bestimmung mit einem Verfahren nach Bradford (1976). Als Farbstoff dient Coomassie Brilliant Blau, das leicht an Proteine bindet und dadurch sein Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm verändert.

Hierzu wurde 1 ml der 1:5 verdünnten Bradfordlösung (Biorad, München) mit einem bestimmten Volumen PR-Lösung versetzt. Nach Mischen und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Umrechnung in Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen erstellt wurde.

B.7.4 SDS-PAGE

Nach der diskontinuierlichen Methode von Schägger und von Jagow (1987) wurden 3-phasische SDS-Gele mit Tricin-haltigem Kathodenpuffer verwendet, da diese sich für die Auftrennung kleiner Proteine wie der HIV Protease (11 kDa) gut eignen. Die verschiedenen Komponenten eines Gels setzten sich wie folgt zusammen:

	„separating gel“	„spacer gel“	„stacking gel“
40 % Acrylamid	8,9 ml	5,4 ml	0,9 ml
Gelpuffer	8,9 ml	8,9 ml	2,8 ml
Glycerin	2,8 ml	-	-
H ₂ O	6,0 ml	2,4 ml	7,5 ml
APS (100 mg/ml)	88,9 µl	88,9 µl	88,9 µl
Temed	8,9 µl	8,9 µl	8,9 µl

Zunächst wurden 13 cm „separating gel“ und 4 cm „spacer gel“ zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen. Zur Verbesserung der Polymerisierung und zum Schutz vor Austrocknung wurden diese mit einigen mm Ampuwa-H₂O überschichtet. Nach dem Festwerden wurde 3 cm „stacking gel“ zugefügt und der Kamm eingesetzt, die Polymerisation erfolgte über Nacht.

Die PR-Lösung wurde auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit 1/3 Volumen 4x SEB Puffer versetzt. Nach kurzem Aufkochen und Zentrifugieren wurde das Gel mit 7 µl dieser Lösung pro Tasche beladen, die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA und 90-100 V über Nacht in der Elektrophoreseeinheit E 5514 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

B.7.5 Silberfärbung des SDS- Proteingels

Die folgenden Waschschrte wurden mit destilliertem Wasser durchgeführt und dauerten jeweils 10 min.

Zunächst wurde das Gel 20–30 min in Fixierlösung 1 langsam geschüttelt, anschließend wurde zweimal gewaschen. Nach Behandlung mit Fixierlösung 2 (1% Glutaraldehyd, 0,2 M NaHCO₃) für 30 min und 2x Waschen wirkte eine ammoniakalkalische AgNO₃ Lösung

20-40 min ein. Diese wurde durch 1x Waschen entfernt, nun erfolgte die Entwicklung bis die Banden die gewünschte Intensität hatten. Durch Zugabe von Entfärbelösung (5% v/v Essigsäure; 10% v/v Ethanol) wurde die Entwicklung beendet, das Gel wurde mehrmals gewaschen und im Gelrocknungsrahmen 24x24 cm (Roth, Karlsruhe) gemäß der Anleitung des Herstellers getrocknet.

B.7.6 Nachweis der HIV Protease im Western Blot

Der Western Blot dient zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Die Proteine werden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend werden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („geblottet“). Durch enzymmarkierte (Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase) Antikörper werden die jeweiligen Proteine spezifisch nachgewiesen.

Zunächst wurde, wie unter B.7.4 beschrieben, eine SDS-PAGE durchgeführt.

Anschließend wurden die Proteine mittels „Semi-dry“ Transfer auf Nitrozellulose übertragen.

Dabei wurde eine in der institutseigenen Werkstatt hergestellte Apparatur und folgende Schichtung verwendet (von oben nach unten):

Graphitkathode; Schwamm; 2 Lagen Whatman-Papier; SDS-Gel; Nitrozellulosemembran; 2 Lagen Whatman-Papier; Schwamm; Graphitanode.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 2 h bei 0,75 A. Die unter den vorhandenen Bedingungen negativ geladenen Proteine wandern bei Anlegen einer Spannung zur Anode und werden so auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran zur Sättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen ca. 1 h mit 0,1% Milchpulver in TBS inkubiert.

Zum Nachweis der HIV Protease dienten folgende nacheinander verwendete Antikörper:

- Anti-HIV Protease, Kaninchen monoklonal (Eurogentec, Herstel, Belgien)
- Anti-Kaninchen IgG, mit alkalischer Phosphatase markiert (Dianova, Hamburg)

Die beiden Antikörper wurden jeweils 1:2000 in TBS verdünnt und inkubierten 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Vor Zugabe des 2. Antikörpers bzw. des Substrates wurde mehrmals mit TBS gewaschen, um den vorhergehenden Antikörper vollständig zu entfernen.

Die Farbreaktion erfolgte mit Chromogen-Substratlösung (Biosens, Oberhaching) und wurde durch mehrfaches Waschen mit destilliertem Wasser beendet, sobald die Banden eine ausreichende Intensität hatten.

B.8 Fluoreszenzsubstrate und ihre Verwendung zur Messung der HIV-1 Protease

Fluoreszenzsubstrate sind in der Enzymologie neben chromogenen Substraten weit verbreitet. Sie erlauben eine kontinuierliche und sensitive Messung der Enzymaktivität.

Jedes Fluoreszenzsubstrat enthält ein sogenanntes „Fluorophor“, welches bei Anregung mit elektromagnetischer Strahlung in einem bestimmten Wellenlängenbereich (Exzitatorionsspektrum) ein Fluoreszenzsignal höherer Wellenlänge emittiert.

Das Fluoreszenzsignal bei Spaltung des Substrates kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen entstehen:

- Direkte Abspaltung des Fluorophors vom Peptidanteil des Substrates.
- Substrat enthält ein Fluorophor sowie einen „Quencher“. Dieser hemmt die Fluoreszenz des Fluorophors, eine Spaltung des Substrates hebt diese Hemmung auf.

Die meisten Fluoreszenzsubstrate bestehen aus 2-4 über Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren, das Fluorophor befindet sich C-terminal. Es wird enzymatisch abgespalten und emittiert dabei ein Fluoreszenzsignal. HIV-1 Protease benötigt, wie andere retrovirale Aspartatproteasen zum Erkennen einer Schnittstelle auf beiden Seiten bestimmte Aminosäurereste, das Fluorophor kann nicht isoliert abgespalten werden (Kraft et al., 1994). Peptidsubstrate der HIV PR müssen aus mindestens 7 Aminosäuren bestehen (Billich et al., 1988). Deshalb sind Quenchsubstrate hier besonders geeignet. Die Peptidsequenzen aller natürlich vorkommender acht Schnittstellen innerhalb des GAG-POL-Vorläuferproteins (A.2) können prinzipiell für die Herstellung synthetischer Substrate verwendet werden.

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Substrate für die HIV-1 Protease entwickelt, bei denen die Hemmung der Fluoreszenz im intakten Substrat auf „Resonanz Energie Transfer“ (RET) beruht (Geoghegan et al., 1990; Meldal, Bredam, 1991; Matayoshi et al., 1990; Wang et al., 1990).

Die durch die Anregungsbestrahlung zugeführte Energie wird dabei durch intramolekulare Elektronenverschiebung auf den „Quencher“ übertragen und nicht als Fluoreszenzsignal abgestrahlt. Dies geschieht umso effizienter, je besser das Emissionsspektrum des Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des „Quenchers“ übereinstimmt (Matayoshi et al., 1990).

B.10 Proteaseaktivitätsmessung im Küvettenformat

B.10.1 Allgemeines

Die Messungen wurden mit dem Fluorometer SFM 25 (Biotek-Kontron, Neufahrn) durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen Küvettenwechsler mit 4 Messplätzen, für jede Küvette kann ein Messwert pro Minute erhalten werden. Die Temperatur wurde mit Hilfe des Thermostaten K20 (Haake, Karlsruhe) auf 30°C eingestellt. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µl. Es wurden Einmalküvetten aus Polystyrol der Firma Müller-Rationlab (Dreieich-Buchschlag) verwendet.

Die Messung und Aufzeichnung der Fluoreszenzwerte erfolgten rechnergestützt mit Hilfe des Programms Flucol4.

B.10.2 Versuchsdurchführung

Nach jedem Einschalten der Fluoreszenzlampe wurden zunächst die Exzitations- und Emissionswellenlängen eingegeben und das Fluorometer mit einer 2000 nM EDANS-Lösung in Assay Puffer geeicht. Das Fluoreszenzsignal dieser Lösung wurde dabei vom Gerät auf 100% gesetzt.

Die Eichlösung wurde durch Zugabe von 10 µl einer 100 µM EDANS Stocklösung zu 490 µl Assay Puffer erhalten.

Anschließend wurden die Konzentration der Eichlösung, Dauer der Messung sowie weitere, die Messtechnik betreffende Parameter in Flucol4 eingegeben.

Der Großteil der kinetischen Fluoreszenzmessungen wurde bei einer Substratkonzentration von 10 bzw. 12 µM durchgeführt.

Zunächst wurden pro Küvette 450 µl Assay Puffer vorgelegt. In 50 µl DMSO waren die jeweiligen Volumina der Substrat-Stocklösung enthalten. Das Differenzvolumen zu 50 µl wurde als reines DMSO zum Assay Puffer zugefügt. Anschließend erfolgte die Substratzugabe. Nach gründlichem Vermischen mit einem Rührstäbchen wurden 2-3 Messpunkte vor Zugabe der Protease gewonnen, um die Stabilität des Fluoreszenzsignals zu überprüfen. Anschließend wurde die Messung unterbrochen und eine definierte Menge HIV PR in die jeweilige Küvette pipettiert. Die zugegebene Proteasemenge wurde so gewählt, dass der Substratumsatz im Bereich von 10 bis 30 nM/min lag.

Nach ca. 15 min bzw. 15 Messpunkten erfolgte die Zugabe der PI in gewünschter Konzentration. Die Reaktionskinetik wurde mindestens über weitere 15-20 Messpunkte verfolgt.

B.10.3 Weiterverarbeitung der Messdaten mit Flucol4 und Flukin49

Flucol4 registriert die Zunahme des Fluoreszenzsignals pro Zeiteinheit. Für die Berechnung des Stoffumsatzes pro Zeiteinheit benötigt die Software die Eichung mit einer EDANS-Lösung bekannter Konzentration. Da für die Eichung des Küvettenfluorometers nur eine EDANS Konzentration vorgesehen ist und das ungespaltene Substrat eine erhebliche Hintergrundfluoreszenz verursacht, wurde die Eichung in Abwesenheit des Substrates durchgeführt. Eine Korrektur des „inner filter effect“ (C.1.7) war deshalb notwendig.

Durch das Auswerteprogramm Flukin49 konnte für einen selbstgewählten Zeitraum der durchschnittliche Stoffumsatz in nM/min ermittelt werden.

B.11 Aktivitätsmessung im Mikrotiterplattenformat

B.11.1 Allgemeines

Um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen, wurde der ursprünglich verwendete Küvettenassay auf Mikrotiterplattenformat übertragen. Die Messungen wurden hauptsächlich auf dem Fluorometer FL 600 (Biotek-Kontron, Neufahrn) durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Geräte HTS 7000 (Perkin Elmer, Weiterstadt) und Fluoroscans Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finnland) getestet.

Im FL 600 wurde für die Anregung ein Filter mit 360 nm Wellenlänge bei 40 nm Bandbreite eingesetzt, der Emissionsfilter hatte eine Wellenlänge von 485 nm bei 20 nm Bandbreite.

Die Steuerungssoftware KC4 erlaubt dem Benutzer, die meisten Parameter für die Messungen selbst zu wählen. **Fett gedruckt : Routinemäßig verwendete Werte.** Diese Voreinstellungen erwiesen sich bezüglich der Ergebnisse und Praktikabilität des Tests als optimal.

Anzahl der Messungen pro Well und Messdurchgang: **10 Messungen pro Well.**

FL 600 führt pro Well die angegebene Anzahl an Einzelmessungen aus, der angegebene Messwert ist das arithmetische Mittel aus den Einzelwerten. Je höher dieser Wert, desto größer die Genauigkeit des mittleren Messwertes, der Messvorgang wird jedoch langsamer.

Zeit zwischen der Plattenbewegung und Beginn der Messung: **0,35 s**. Je größer der zeitliche Abstand, desto unwahrscheinlicher sind Artefakte durch Bewegung des Flüssigkeitsspiegels. Sensitivität des Photomultipliers, einstellbarer Bereich 0-220: **200** bei Verwendung von Mikrotiterplatten mit **schwarzem**, **170** für solche mit **transparentem Boden**. Der Wert wurde so gewählt, dass das Fluoreszenzsignal von 1000 nM EDANS, 10 μ M Substratlösung innerhalb des dynamischen Bereichs von 0-99999 Fluoreszenzeinheiten (FU) lag. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in schwarzen 96-Well Platten mit einem Volumen von 200 μ l pro Well. Im Laufe der Testentwicklung kamen mehrere Plattentypen der Firmen Nunc und Corning (Wiesbaden) sowie Greiner (Frickenhausen) zur Anwendung. Jeder Messwert wurde im Doppelansatz ermittelt. Je nach verwendetem Plattentyp wurde ein Substratumsatz im Bereich von 5-50 nM/min eingestellt.

B.11.2 Versuchsdurchführung

Die Reaktionslösungen wurden in Eppendorfgläsern vorbereitet und anschließend auf die Mikrotiterplatten überführt. Zunächst wurde 90% des angestrebten Endvolumens in Form von Assay Puffer vorgelegt. Die restlichen 10% DMSO setzten sich aus Substrat- und PI Stocklösung sowie aus reinem DMSO zusammen.

Die Reaktion wurde wie im Küvettenformat durch Proteasezugabe gestartet. Im Unterschied dazu wurden die PI bereits vor Reaktionsbeginn vorgelegt; die Messung des ungehemmten Stoffumsatzes erfolgte in gesonderten Wells (Abb. B.1).

Für die weitere enzymkinetische Auswertung erwies sich die Bestimmung des Stoffumsatzes in Gegenwart von 4-5 PI-Konzentrationen als ausreichend.

Das in Abb. B.1 gezeigte Pipettierschema ermöglicht die Untersuchung der phänotypischen Resistenz gegen 6 PI auf einer Platte. Für Lopinavir lagen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch keine Daten vor. Die verwendeten PI-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie die Berechnung des K_i sowohl bei sensitiven als auch hochresistenten Proteasen ermöglichten. Wenn zum Zeitpunkt der Messung genotypische Resistenzdaten vorhanden waren, was meist der Fall war, wurden die eingesetzten PI-Konzentrationen entsprechend angepasst.

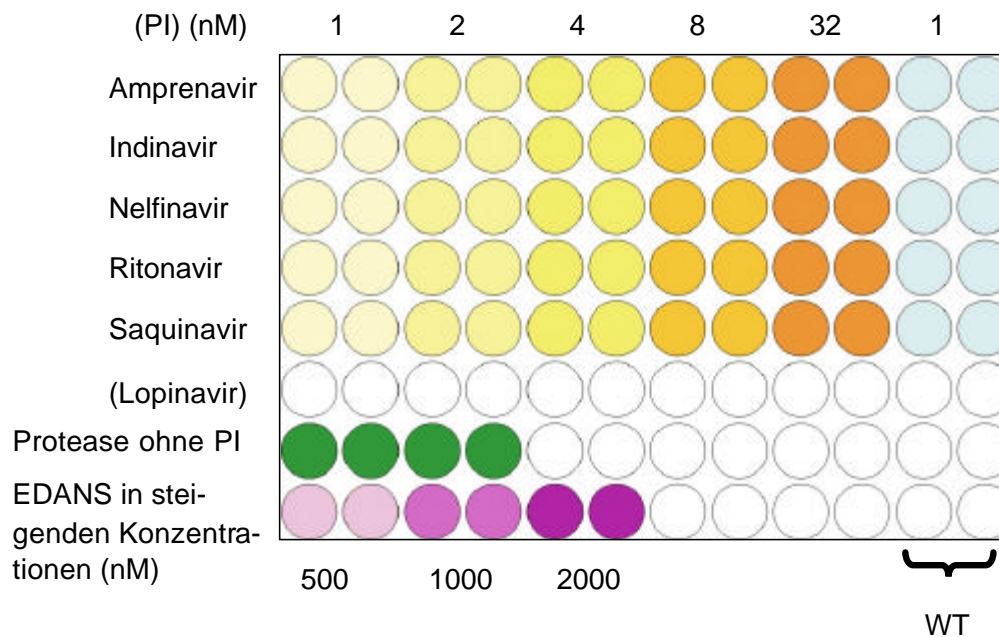


Abb. B.1. Belegung einer Mikrotiterplatte für die Resistenzbestimmung einer Patientenprotease. Jede PI-Konzentration wird im Doppelansatz, untersucht, v_0 wird in 4-fachem Ansatz bestimmt. v_0 wird möglichst präzise bestimmt, da für jeden Messwert das Verhältnis v_i/v_0 gebildet und für die weitere enzymkinetische Auswertung verwendet wird.

Die Erzeugung eines Messpunktes pro Well in einer wie in Abb. B.1 belegten Platte benötigte mit den oben angegebenen Parametern 60-80 s. In der Regel wurde die Reaktion über 25-30 solcher Einzelmessungen verfolgt, was einer gesamten Messdauer von insgesamt 30-45 min entspricht.

B.11.3 Erstellung einer Eichkurve mit EDANS

Im Mikrotiterplattenformat wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des Fluorophors EDANS eine Eichgerade erstellt (Abb. B.2). Bei der Eichung mit mehreren Messpunkten störte die Hintergrundfluoreszenz des ungespaltenen Substrates nicht. Um den Versuchsbedingungen der kinetischen Messungen möglichst nahe zu kommen, wurde in Anwesenheit von 10 μM Substrat und 10% DMSO geeicht.

Die eingesetzten EDANS-Konzentrationen entsprechen dem im Messzeitraum bei den verschiedenen PI-Konzentrationen zu erwartenden Stoffumsatz von 0-2000 nM. Die Steuerungssoftware erstellt durch lineare Regression eine den Messpunkten möglichst gut angepasste Gerade.

Zwischen der Zunahme der EDANS-Konzentration und des zugehörigen Fluoreszenzsignals besteht ein linearer Zusammenhang: $\Delta F = a * \Delta c(\text{EDANS})$, m ist hierbei die Steigung der Eichgeraden.

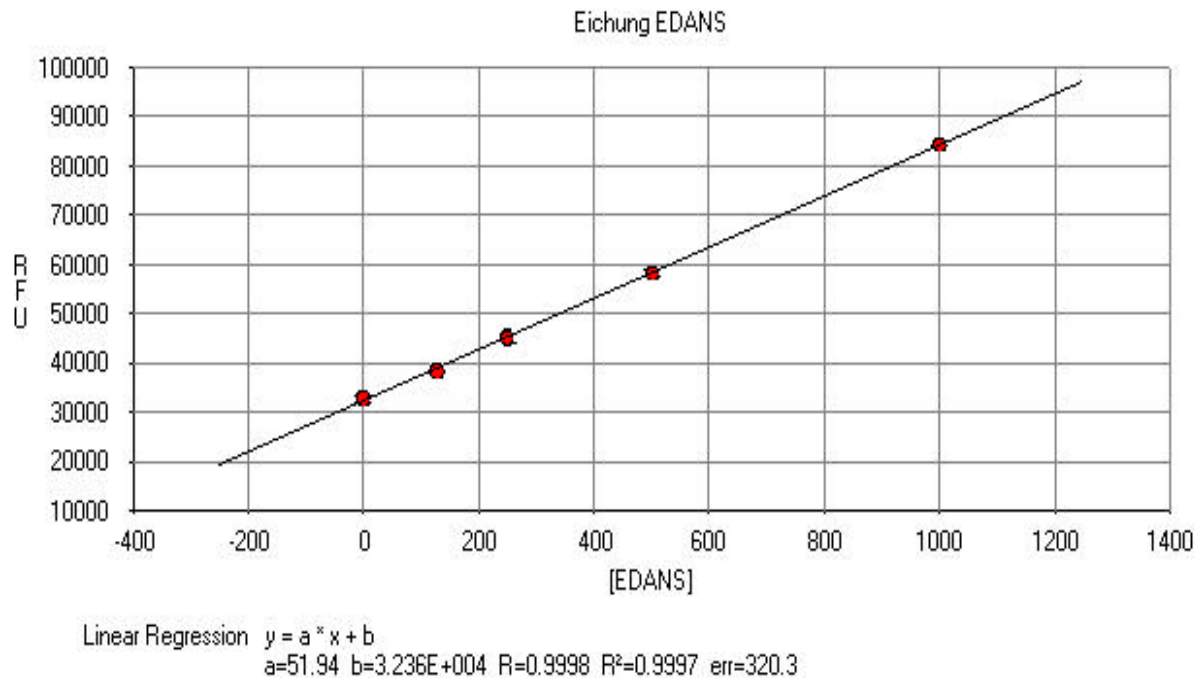


Abb.B.2. Eichkurve, erstellt mit EDANS (Biotek FL600, Biotek-Kontron, Neufahrn)
 X-Achse: EDANS-Konzentration (nM), Y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten.

Die getesteten Mikrotiterplattenlesegeräte geben die durchschnittliche Zunahme an fluoreszierenden Einheiten pro Zeiteinheit über für einen vom Benutzer zu wählenden Zeitraum innerhalb der Messung an. Die Division dieses Wertes durch die Steigung m der Eichgeraden ergibt den mittleren Stoffumsatz pro Zeiteinheit v (nM/min). Da die Eichgerade ebenso wie die kinetischen Messungen in Gegenwart von 10 μM Substrat erstellt wurde, ist keine Korrektur des „inner filter effect“ (C.1.7) notwendig. Zur enzymkinetischen Auswertung benötigt das Kurvenanpassungsprogramm FigureP das Verhältnis v_i/v_0 und die zugehörige PI-Konzentration. nach Eingabe der entsprechenden Formeln berechnet die Steuerungssoftware KC4 für das Mikrotiterplattenlesegerät Fl 600 v sowie das Verhältnis v_i/v_0 für jede Probe (B.12) automatisch.

B.12 Theoretische Grundlagen der Enzyminhibition

Enzyminhibitoren sind Hemmstoffe, die durch Wechselwirkung mit Enzymmolekülen deren katalytische Aktivität vermindern. Irreversible Inhibitoren binden dabei kovalent an das Enzymmolekül und können physikalisch (z. B. durch Dialyse) nicht wieder entfernt werden.

Dagegen zeigen reversible Inhibitoren nichtkovalente Enzymbindung, die leicht durch Dialyse wieder gelöst werden kann.

Abhängig von der Bindungsstelle am Enzymmolekül unterscheidet man kompetitive und nichtkompetitive Inhibitoren. Kompetitive Inhibitoren binden an das aktive Zentrum des Enzyms und treten dabei in direkte Konkurrenz mit dem Substrat. Nichtkompetitive Inhibitoren binden an andere Stellen des Enzymmoleküls und beeinflussen die Enzymaktivität durch Konformationsänderung.

Bei einer reversiblen Enzyminhibition stellt sich zwischen freiem Enzym, ungebundenem Inhibitor und Enzym-Inhibitor-Komplex ein Gleichgewicht ein:



Dieses ist durch die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i (Inhibitionskonstante) charakterisiert:

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI] \quad (\text{Gl. B.1})$$

Nach Morrison (1982) werden reversible Inhibitoren nach dem Verhältnis von Inhibitorkonzentration I_t zur Enzymkonzentration E_t und nach der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung zwischen E, I und EI in vier Gruppen eingeteilt (Tab. B.1).

Inhibitor-Typ	Verhältnis I_t zu E_t	Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung zwischen E, I und EI
klassisch	$[I_t] \gg [E_t]$	schnell
fest bindend (tight-binding)	$[I_t] \cong [E_t]$	schnell
Langsam bindend (slow-binding)	$[I_t] \gg [E_t]$	langsam
Langsam, fest bindend (slow, tight-binding)	$[I_t] \cong [E_t]$	langsam

Tab. B.1. Einteilung reversibler Enzyminhibitoren (Morrison, 1982).

$[E_t]$ und $[I_t]$ sind die Gesamtkonzentrationen an freiem und gebundenem Enzym bzw. Inhibitor

Die Enzymhemmung hängt außerdem entscheidend vom Verhältnis $[E_t]/K_i$ ab (Bieth, 1974):

Wenn $[E_t]/K_i \approx 1$ (Inhibitor liegt etwa zu gleichen Teilen frei und an Enzym gebunden vor, **Gleichgewichtsbedingungen**), gilt folgende allgemeine Gleichung für kompetitive, festbindende Inhibitoren (Morrison, 1969):

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[E_t] + [I_t] + K_{iapp} - \left\{ ([E_t] + [I_t] + K_{iapp})^2 - 4[E_t] \cdot [I_t] \right\}^{\frac{1}{2}}}{2[E_t]} \quad (\text{Gl. B.2})$$

v_i = Gleichgewichtsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors, gemessen als $\Delta[\text{Produkt}] / \text{min}$

v_0 = Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors, gemessen

$[E_t]$ = Gesamtkonzentration des Enzyms (frei und komplexiert)

$[I_t]$ = Gesamtkonzentration des Inhibitors (frei und komplexiert)

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei einer bestimmten Substratkonzentration.

Unter sog. **Titrationbedingungen** bei $[E_t]/K_i > 1$ liegt der Inhibitor größtenteils als Enzym-Inhibitor-Komplex vor, K_i kann in der allgemeinen Gleichung für festbindende Inhibitoren vernachlässigt werden, die Gleichung (1) kann folgendermaßen umgeformt werden:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[I_t]}{[E_t]} \quad (\text{Gl. B.3})$$

Wenn $[E_t]/K_i < 1$ überwiegt bei weitem ungebundener Inhibitor, man spricht in diesem Fall von **klassischer Inhibition**. Hier gilt die Gleichung:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + [I_t]/K_{iapp}} \quad (\text{Gl. B.4})$$

Die Grenzen zwischen klassischen und Gleichgewichtsbedingungen sowie zwischen Gleichgewichts- und Titrationsbedingungen sind fließend.

Unabhängig von der verwendeten Gleichung gilt für die Bestimmung der Variablen E_t und K_i :

Je niedriger die Enzymkonzentration, desto genauer kann die Inhibitionskonstante K_i bestimmt werden. Je höher die Enzymkonzentration gewählt wird, desto genauer kann diese selbst bestimmt werden.

Die scheinbare Inhibitionskonstante K_{iapp} steht mit der tatsächlichen Inhibitionskonstante K_i in folgendem Zusammenhang:

$$K_{iapp} = K_i (1 + [S]_0 / K_m) \quad (\text{Gl. B.5})$$

K_{iapp} kann demnach näherungsweise mit K_i gleichgesetzt werden, wenn die Substratkonzentration deutlich unter der K_m liegt.

Für die Enzymkonzentration im Versuchsansatz gilt:

$$E_t = \frac{v_0([S] + K_m) / [S]}{k_{cat}} \quad (\text{Gl. B.6})$$

k_{cat} = katalytische Konstante

[S] = Substratkonzentration

v_0 = Stoffumsatz

Zur Auswertung des in dieser Arbeit entwickelten enzymkinetischen Fluoreszenztests wird die Gleichung B.2 zur Kurvenanpassung verwendet.

B.13 Enzymkinetische Auswertung mit Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_i) des Enzym-Inhibitor-Komplexes

Der Zweck der weiteren Datenverarbeitung war die Ermittlung der K_i der untersuchten PR und die Quantifizierung ihrer Resistenz durch Resistenzfaktoren.

Dies erfolgte mit Hilfe des Programms FigureP (Biosoft, Cambridge).

Die PI Konzentrationen sowie das zugehörige Verhältnis von gehemmt zu ungehemmt Stoffumsatz v_i/v_0 wurden als Wertepaare eingegeben, im folgenden exemplarisch für eine Patientenprotease und den PI Saquinavir gezeigt:

[Saq]	v_i/v_0
0,5	0,62
1,0	0,43
2,0	0,20
4,0	0,08

FigureP bestimmt durch nichtlineare Regression die vom Benutzer als „variabel“ gekennzeichneten Parameter.

Für die Berechnung der Regressionskurve stehen mehrere Formeln zur Verfügung, für die Kurvenanpassung wurde in der Regel die Formel für festbindende reversible Inhibitoren (1) unter Gleichgewichtsbedingungen (Gl. B.2) verwendet. Dabei kann zwischen zwei Möglichkeiten der Kurvenanpassung gewählt werden:

- 1.) mit konstanter Enzymkonzentration: In diesem Fall wird diese vor der Berechnung eingegeben. Ihr Wert wird entweder berechnet oder experimentell bestimmt (C.3).
- 2.) mit variabler Enzymkonzentration: Hier kann FigureP sowohl K_i als auch $[E_t]$ frei wählen.

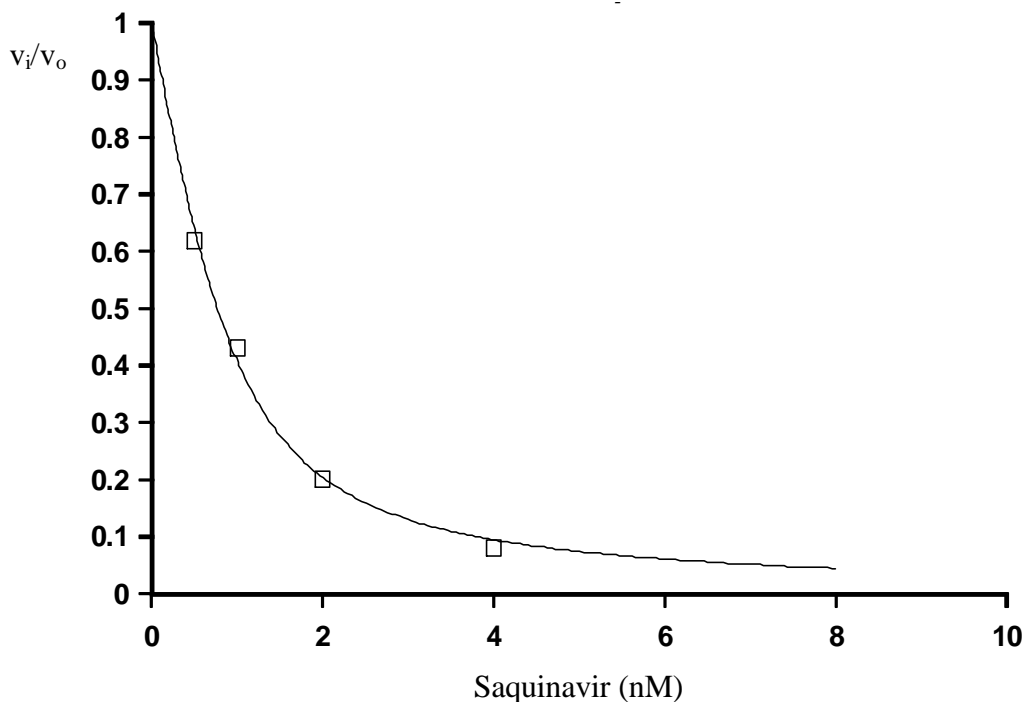


Abb. B.4. Kurvenanpassung für Saquinavir und eine aus Patientenmaterial rekombinant hergestellte HIV PR.

Folgende Daten werden ausgegeben:

$$y = 1 - (E_t + x + K_i - ((E_t + x + K_i)^2 - 4 * E_t * x)^{0.5}) / (2 * E_t)$$

PARAMETER	VALUE	± SE	± 95,0% CI
E_t	0,86	0,17	0,755
K_i	0,34	0,07	0,298

Die Dissoziationskonstante K_i sowie ggf. die Enzymkonzentration werden mit Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall angegeben.

B.14 Berechnung der Resistenzfaktoren

Die Resistenzfaktoren der Patienten PR wurden durch Division ihrer K_i durch die entsprechenden WT Werte berechnet. Sie quantifizieren somit den Resistenzgrad relativ zum WT.

Als Vergleichsdaten dienten genotypische Resistenzprofile, die unter der Leitung von PD Dr. J. Eberle am Max von Pettenkofer-Institut bestimmt wurden. Die im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführte Resistenzbestimmung beruht auf der Sequenzierung des PR- und RT-Gens. Aus den vorhandenen Mutationen wird auf das Resistenzprofil geschlossen. Dabei fließen Informationen aus online verfügbaren Datenbanken (A.5.1) in die Erstellung des Befundes ein.

C Ergebnisse

C.1 Etablierung und Optimierung des Fluoreszenzassays und seiner Auswertung

Die unter C.1 beschriebenen Experimente dienten der Ermittlung der optimalen Bedingungen für den enzymatischen Fluoreszenzassay. Die wichtigste Vorgabe war dabei ein stabiler Stoffumsatz bei ausreichender Intensität des Fluoreszenzsignals während des gesamten Messzeitraums von ca. 45-60 min. Zudem sollten die Ergebnisse enzymkinetisch auswertbar sein. Als größtes Problem erwies sich in diesem Zusammenhang die relativ schlechte Löslichkeit des Fluoreszenzsubstrates in wässrigen Lösungen, z. B. im verwendeten Assay Puffer. Die schließlich gewählten und im folgenden näher diskutierten Testbedingungen sind ein Kompromiss zwischen teilweise gegensätzlichen Anforderungen an den Assay.

C.1.1 Substrat- und DMSO-Konzentration

Zunächst wurden die Messungen mit 16 μM Substrat und 5% (v/v) DMSO durchgeführt. Die relativ hohe Substratkonzentration wurde gewählt, um ein für die Detektion ausreichend starkes Signal zu erreichen.

Trotz der dadurch verursachten erheblichen Hintergrundfluoreszenz und dem daraus resultierenden höheren Startpunkt zu Beginn der Messung war der Messbereich ausreichend.

Bei Messungen in Mikrotiterplatten war jedoch in Wells mit stark inhibierter Enzymaktivität eine Abnahme des Fluoreszenzsignals festzustellen. Dies beeinflusste den Quotienten v/v_0 teilweise so stark, dass die betreffenden Werte nicht enzymatisch ausgewertet werden konnten. Als mögliche Ursache kann eine Präzipitation des Substrates mit resultierender Verringerung der Hintergrundfluoreszenz angenommen werden.

In diesem Zusammenhang wurde die Stabilität des Fluoreszenzsignals bei mehreren Substrat- und DMSO-Konzentrationen untersucht. Zusatz von DMSO verbessert die Löslichkeit hydrophober Substanzen.

Abb. C.1 zeigt die Registrierung des Fluoreszenzverlaufs durch das Küvettenfluorometer SM25 (Biotek-Kontron) unter Verwendung der Software Fluco14. Durch Eichung mit EDANS wird dabei aus dem registrierten Fluoreszenzsignal die Konzentration des Spaltpro-

duktes PIVQ-EDANS berechnet und als y-Achse dargestellt. Sowohl die absolute Höhe der Spaltproduktkonzentration als auch ihre Veränderung pro Zeiteinheit sind graphisch dargestellt.

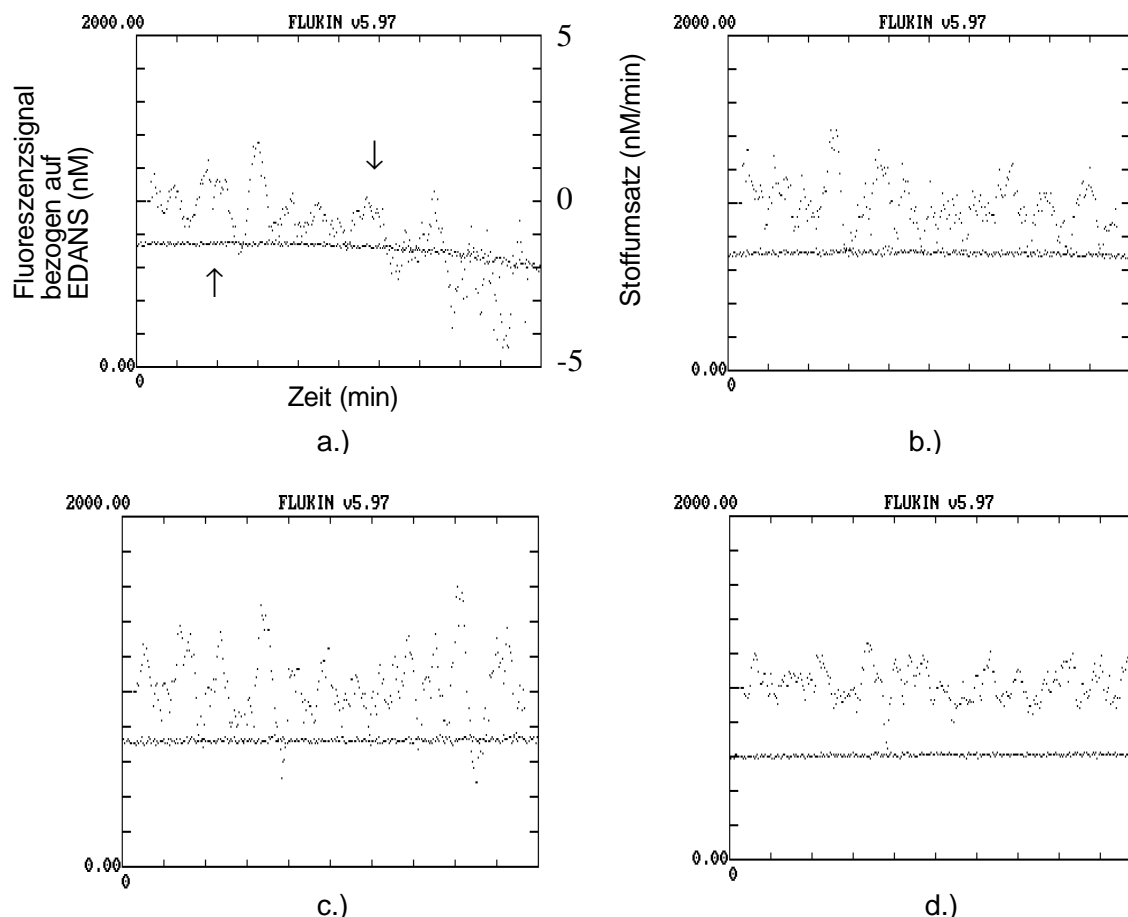


Abb. C1. Kontinuierliche Registrierung des Fluoreszenzsignals von Substratlösungen ohne Proteasezugabe über einen Zeitraum von 5 h.

X-Achse: Zeit

Y-Achse: Fluoreszenzsignal, auf EDANS-Eichlösung bezogen (hier 2000 nM)

a.) 16 μM Substrat, 5% (v/v) DMSO

b.) 16 μM Substrat, 10% (v/v) DMSO

c.) 16 μM Substrat, 15% (v/v) DMSO

d.) 8 μM Substrat, 10% (v/v) DMSO

Nach oben gerichteter Pfeil: Fluoreszenzsignal bezogen auf die zugehörige EDANS-Konzentration.

Nach unten gerichteter Pfeil: Veränderung des Fluoreszenzsignals pro Zeiteinheit.

Im in Abb. C.1 dargestellten Experiment wurde mit 2000 nM EDANS geeicht und dieses Fluoreszenzsignal auf 100 % gesetzt. Die gemessenen Substratlösungen zeigen durch unvollständige Hemmung der Fluoreszenz von EDANS ein erhebliches Hintergrundsignal. Durch Messung dieses Signals kann die Stabilität der Substratlösungen geprüft werden.

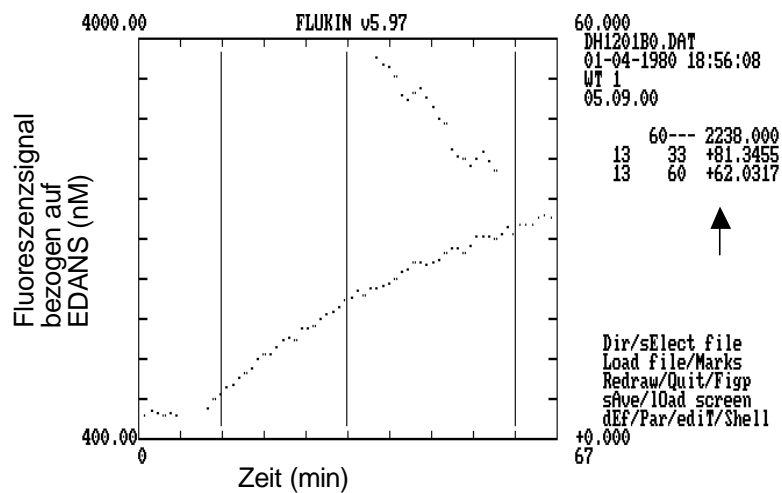
Je niedriger die Substratkonzentration und je höher die DMSO-Konzentration, desto stabiler ist das Fluoreszenzsignal. Sowohl bezüglich der absoluten Höhe der Hintergrundfluoreszenz als auch der Stabilität der Lösungen bei 30°C erwiesen sich 10 µM Substrat und 10% DMSO als optimale Konzentrationen und wurden deshalb routinemäßig eingesetzt.

C.1.2 Stabilisierende Adjuvantien

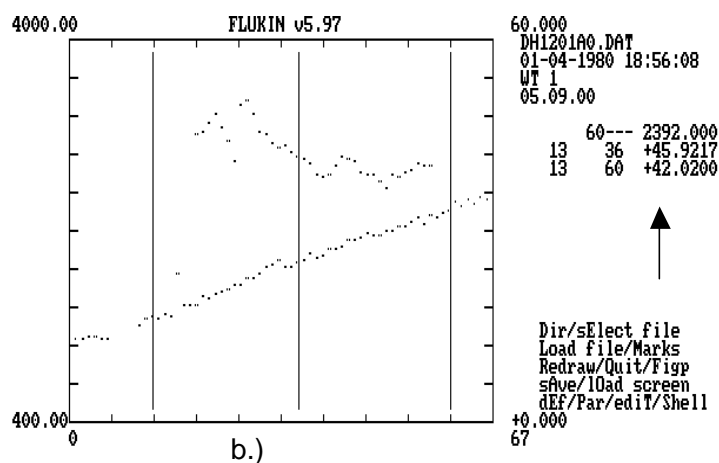
Während des Fluoreszenztests ist eine stabile, gleichbleibende Proteaseaktivität wichtig. Dies ist eine Voraussetzung für die enzymatische Auswertung der Quotienten v_i/v_0 bei verschiedenen PI-Konzentrationen (B.13). Die HIV PR kann jedoch während des Assays auf unterschiedliche Weise inaktiviert werden:

- Autoproteolytische Spaltung
- Absorption an Kunststoffoberflächen oder Präzipitation auf Grund hoher Hydrophobizität
- Oxidation der SH-Gruppen

Zur Stabilisierung der Protease während des Tests wird die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA) oder von Detergentien wie Triton X-100 oder Nonidet P-40 empfohlen (Matayoshi et al., 1990; Krafft et al., 1994). Im Überschuss zugegebenes BSA besetzt die Bindungsstellen für Proteine im Reaktionssystem (z. B. Wand des Reaktionsgefäßes). Eine unspezifische Bindung und damit verbundene Inaktivierung der HIV PR wird so verhindert. Detergentien bilden als Moleküle mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil in wässriger Lösung Micellen, in die sie Proteasemoleküle einschließen und dadurch stabilisieren. Dies geschieht erst oberhalb einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Detergens, der kritischen Micellen-Konzentration (CMC). Sie beträgt 0,29 mM für NP-40 und 0,24 mM für Triton X-100. Sowohl Triton als auch NP-40 wurden im Assay in einer Konzentration von 0,1% (v/v) eingesetzt, dies entspricht, wenn man bei beiden Detergentien eine mittlere molare Masse von 625 g/mol annimmt, 1,6 mM. Dieser Wert liegt deutlich über den beiden „CMC“, so dass eine effiziente Micellenbildung mit Schutzwirkung auf die Protease angenommen werden kann.



a.)



b.)

Abb. C.2. Proteaseaktivität ohne (a) sowie mit Zusatz von NP-40 (b). Der Stoffumsatz ist nach Zugabe von Triton bzw. NP-40 im Messzeitraum (hier 67 min) wesentlich stabiler. Die Stoffumsätze wurden in den durch die Markierungen gekennzeichneten Messzeiträumen bestimmt (in nM/min) und sind jeweils rechts der Diagramme angegeben (durch Pfeile markiert). Der obere Zahlenwert gibt den durchschnittlichen Substratumsatz im 1. Messzeitraum an, der untere Zahlenwert bezieht sich jeweils auf den 2. Messzeitraum.

Die Wirkung von NP-40 wird durch Abb. C.2 verdeutlicht. Trotz gleicher zugegebener Proteasemenge zeigen die beiden Ansätze deutlich unterschiedliche Substratumsätze. Der Ansatz ohne Detergenzusatz weist anfangs eine relativ hohe Reaktionsgeschwindigkeit (81,3 nM/min) auf, die in der zweiten Hälfte des Testes auf 62,0 nM/min abfällt. Im Vergleich dazu vermindert die Zugabe von 0,1% NP-40 zwar den Stoffumsatz auf 45,9 nM/min, stabilisiert ihn aber weitgehend (42,0 nM/min) während der gesamten Laufzeit des Tests, hier ca. 70 min.

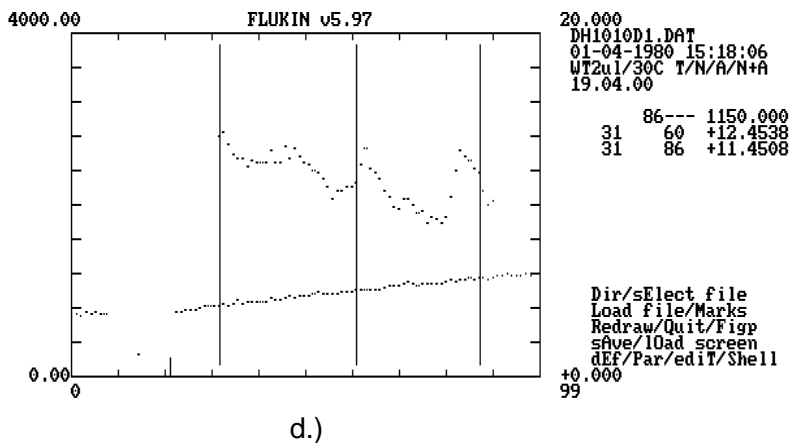
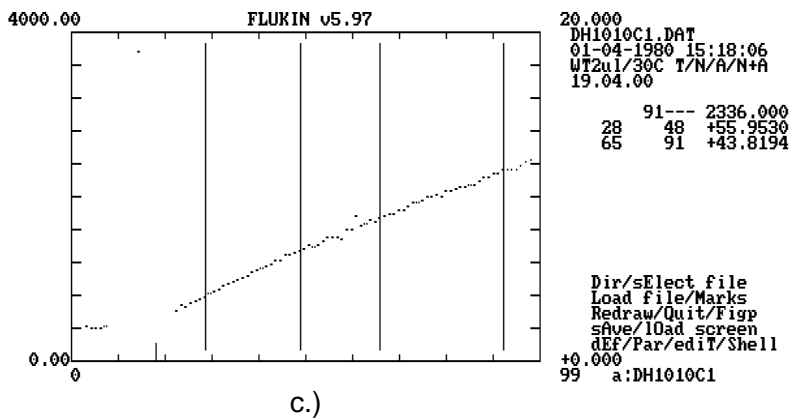
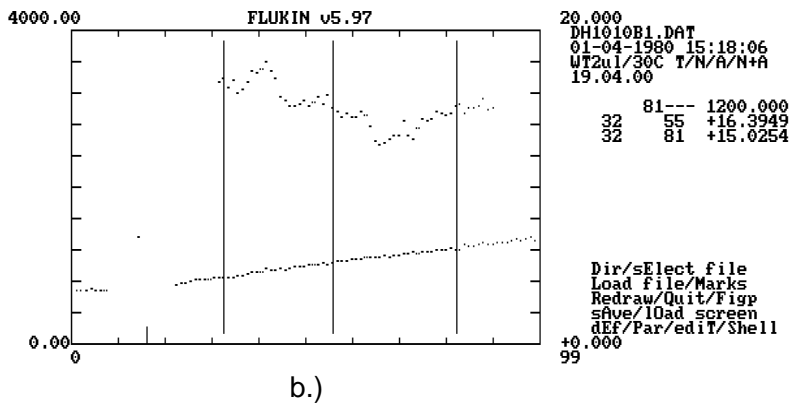
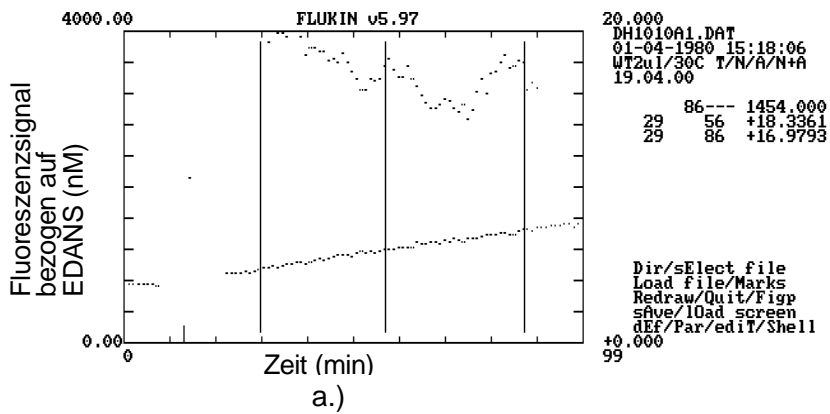


Abb C.3. Vergleich der Proteaseaktivität in Gegenwart von Triton (a), NP40 (b), BSA (c), sowie NP40 und BSA (d). Zugabe von Triton X-100 und von NP-40 bewirken jeweils eine ähnliche Enzymaktivität mit weitgehend stabilem Stoffumsatz. Nach BSA-Zugabe (c) zeigt die PR eine deutlich höhere, aber auch instabilere Aktivität, während Zusatz von NP 40 und von BSA (d) einen auf niedrigem Niveau stabilen Substratumsatz zur Folge hat. Diese Ergebnisse bestätigten sich in weiteren Experimenten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde dem Assay Puffer für die weiteren Messungen 0,1% (v/v) NP-40 zugefügt. BSA wurde nicht verwendet, da es in Gegenwart von NP-40 nach Abb. C.3.d keinen signifikanten Vorteil bringt.

C.1.3 Handhabung der PI, des Assay Puffers und des Fluoreszenzsubstrates

Die einheitliche Handhabung der Reaktionspartner des Fluoreszenztests gewährleistet möglichst geringe Abweichungen in den Eigenschaften der Reaktionslösungen verschiedener Ansätze. Zahlreiche Experimente zur Stabilität der verschiedenen Komponenten des Fluoreszenzassays führten zu folgende Angaben zur Stabilität und günstigsten Lagerungsbedingungen: Die fünf Proteaseinhibitoren Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir sind in reinem DMSO recht stabil und lassen sich so bei 4°C ohne messbaren Aktivitätsverlust über einige Wochen gut lagern. Wässrige Lösungen, z. B. in Assay Puffer, verlieren dagegen rasch an Aktivität. Bei Amprenavir und Nelfinavir wurde eine deutliche Abnahme der Wirksamkeit durch häufiges Auftauen der bei ca. -20°C oder 2-8°C gelagerten Stocklösung beobachtet.

Die PI wurden wie folgt gehandhabt, um ihre Wirksamkeit möglichst konstant und den Arbeitsaufwand möglichst gering zu halten: Die Lagerung als Feststoff erfolgte bei ca. -20 °C. Durch Auflösen des Feststoffes in DMSO wurde eine 10 mM Stocklösung hergestellt. Diese wurde 1:100 auf 100 µM verdünnt, von hier ausgehend erfolgten die weiteren Verdünnungsschritte jeweils 1:10 bis 0,1 µM. Darüber hinaus wurden hieraus auch Lösungen mit Konzentrationen von 0,5 und 5 µM hergestellt.

Die Lagerung der aliquotierten PI-Lösungen erfolgte bei ca. -20°C. Für die Herstellung der Versuchsansätze wurden in der Regel Lösungen von 0,1 bis 5 µM eingesetzt. Diese wurden 5 mal verwendet, anschließend wurden die Aliquots verworfen. Aus praktischen Gründen erfolgte die Aufbewahrung zwischen den Messungen bei 2-8°C.

Der Assay Puffer wurde als 2x Lösung hergestellt und ist in dieser Form mehrere Wochen bei 2-8°C haltbar. Je nach Bedarf wurde er 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und 0,1% v/v NP-40 hinzugefügt. Der gebrauchsfertige Puffer konnte bei 2-8°C mindestens eine Woche gelagert werden.

Das Fluoreszenzsubstrat wurde in DMSO gelöst und aliquotiert. Die Konzentration dieser Stocklösung betrug 0,4 mM, sie wurde bei ca. -20°C und unter Schutz vor Lichteinstrahlung aufbewahrt.

C.1.4 Vergleich der Fluoreszenzspektren von EDANS und des Spaltproduktes PIVQ-EDANS

Die optimalen Exzitations- und Emissionswellenlängen für den enzymkinetischen Fluoreszenztest wurden durch Aufzeichnung der entsprechenden Spektren bestimmt.

Abb. C.4 zeigt das Exzitationsspektrum einer 500 nM Lösung der Spaltprodukte PIVQ-EDANS (Prolin-Isoleucin-Valin-Glutamin-(5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthalensulfonat)) und DABCYL-GABA-SQNY (4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoat- γ -Aminobuttersäure-Serin-Glutamin-Asparagin-Tyrosin). Im folgenden werden diese vereinfacht als „Spaltprodukte“ oder gespaltenes Substrat bezeichnet. Die Spaltproduktlösung wurde durch vollständige Proteolyse des Fluoreszenzsubstrates mit HIV PR im Überschuss gewonnen. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 355-360 nm und weicht damit leicht von dem für reines EDANS angegebenen Wert von 340 nm (Matayoshi et al., 1990) ab.

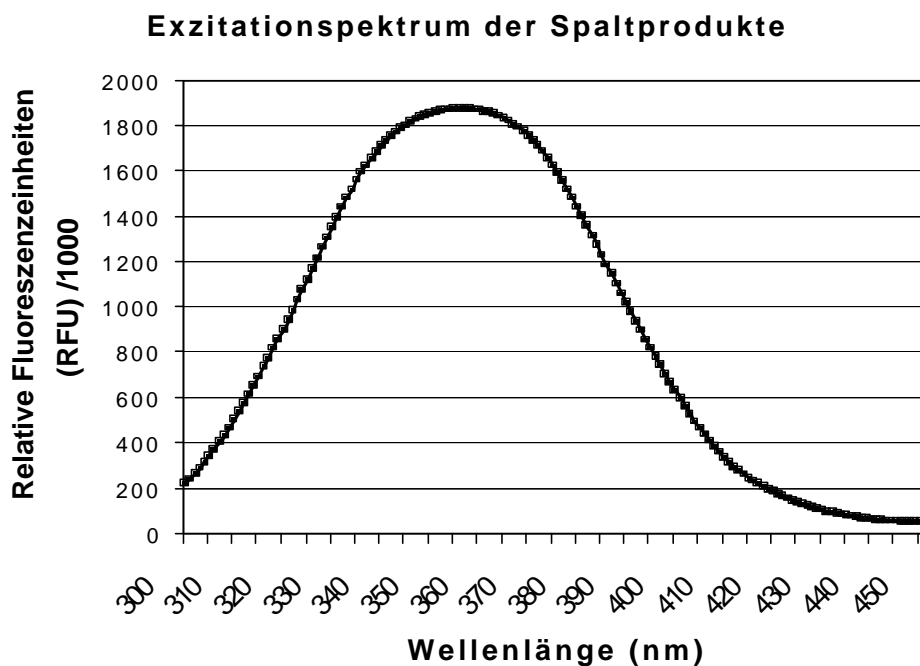


Abb. C.4. Exzitationsspektrum der Spaltprodukte PIVQ-EDANS und DABCYL-SQNY. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde in Abhängigkeit von der anregenden Wellenlänge untersucht.

Zur Bestätigung wurden die Emissionsspektren der Spaltprodukte bei Anregung mit 340 nm und 360 nm verglichen (Abb. C.5).

Anregung durch 360 nm führt dabei zu stärkeren Fluoreszenzsignalen.

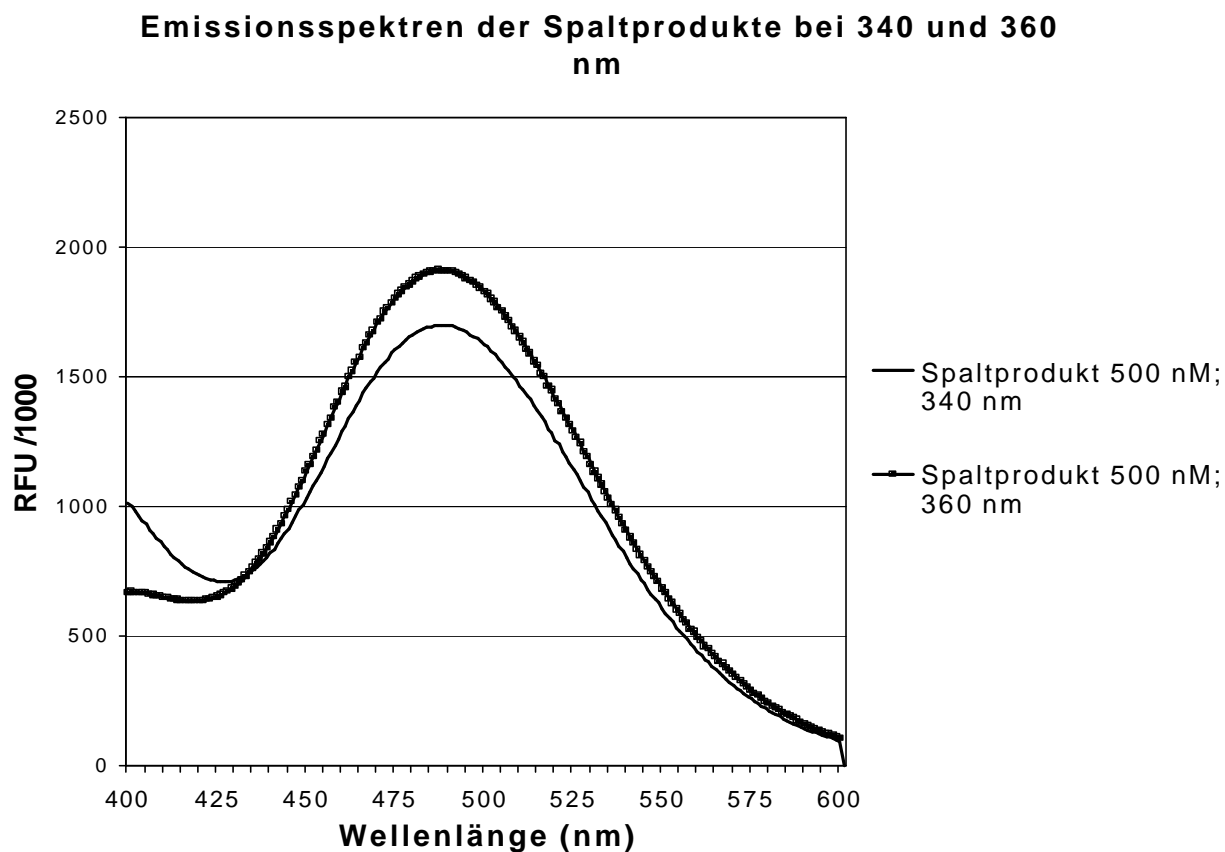


Abb. C.5. Emissionsspektrum der Spaltprodukte: Die Intensität der Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge jeweils bei 340 und 360 nm Exzitationswellenlänge untersucht.

Diesen Ergebnissen folgend wurde sowohl im Küvetten- als auch im Mikrotiterplattenformat 360 nm als Exzitationswellenlänge gewählt.

Da für die Eichung kommerziell erhältliches EDANS in Reinform verwendet wurde, in der kinetischen Messung aber PIVQ-EDANS gemessen wird, musste diejenige Emissionswellenlänge gewählt werden, bei der beide Moleküle ein Fluoreszenzsignal gleicher Intensität generieren.

In Abb. C.6 sind die Emissionsspektren von EDANS und Spaltprodukten in einer Konzentration von jeweils 500 nM dargestellt. Die Exzitationswellenlänge betrug jeweils 360 nm.

Der Schnittpunkt der beiden Kurven liegt bei ca. 485 nm. Bei dieser Wellenlänge erzeugen äquimolare EDANS und Spaltproduktlösungen Fluoreszenzsignale gleicher Intensität, deshalb kann hier mit EDANS geeicht werden. Sowohl im Küvettenformat als auch im Mikrotiterplattenformat wurde deshalb 485 nm als Emissionswellenlänge verwendet.

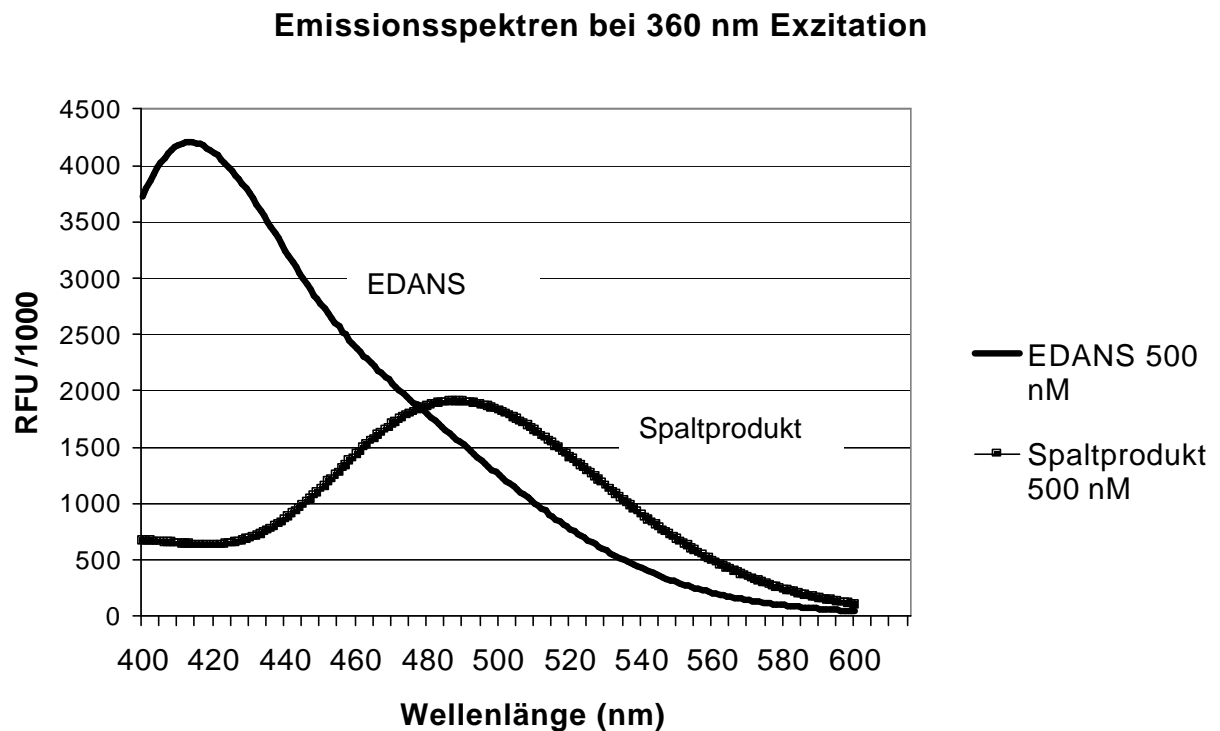


Abb. C.6. Vergleich der Emissionsspektren einer 500 nM EDANS- und einer 500 nM Spaltproduktlösung.

C.1.5 Vergleich der Fluoreszenz von PIVQ-EDANS-Lösungen verschiedener Konzentrationen

Bei 360 nm Exzitationswellenlänge und 485 nm Emissionswellenlänge erzeugen äquimolare EDANS- und Spaltproduktlösungen gleich starke Fluoreszenzsignale. Zur Bestätigung dieses Sachverhaltes im Küvettenfluorometer SM25 diente folgendes Experiment: Durch Zugabe einer Lösung mit Protease im Überschuss wurde ein vollständiger Umsatz von 250, 500, 1000, bzw. 2000 nM Substratlösungen erreicht. Die Reaktion wurde beendet, als der Stoffumsatz pro Zeiteinheit praktisch auf Null abgesunken war (Abb. C.7).

Die Eichung auf 100% erfolgte mit einer 2000 nM EDANS Lösung, der gesamte Messbereich entspricht 200%, also 4000 nM EDANS.

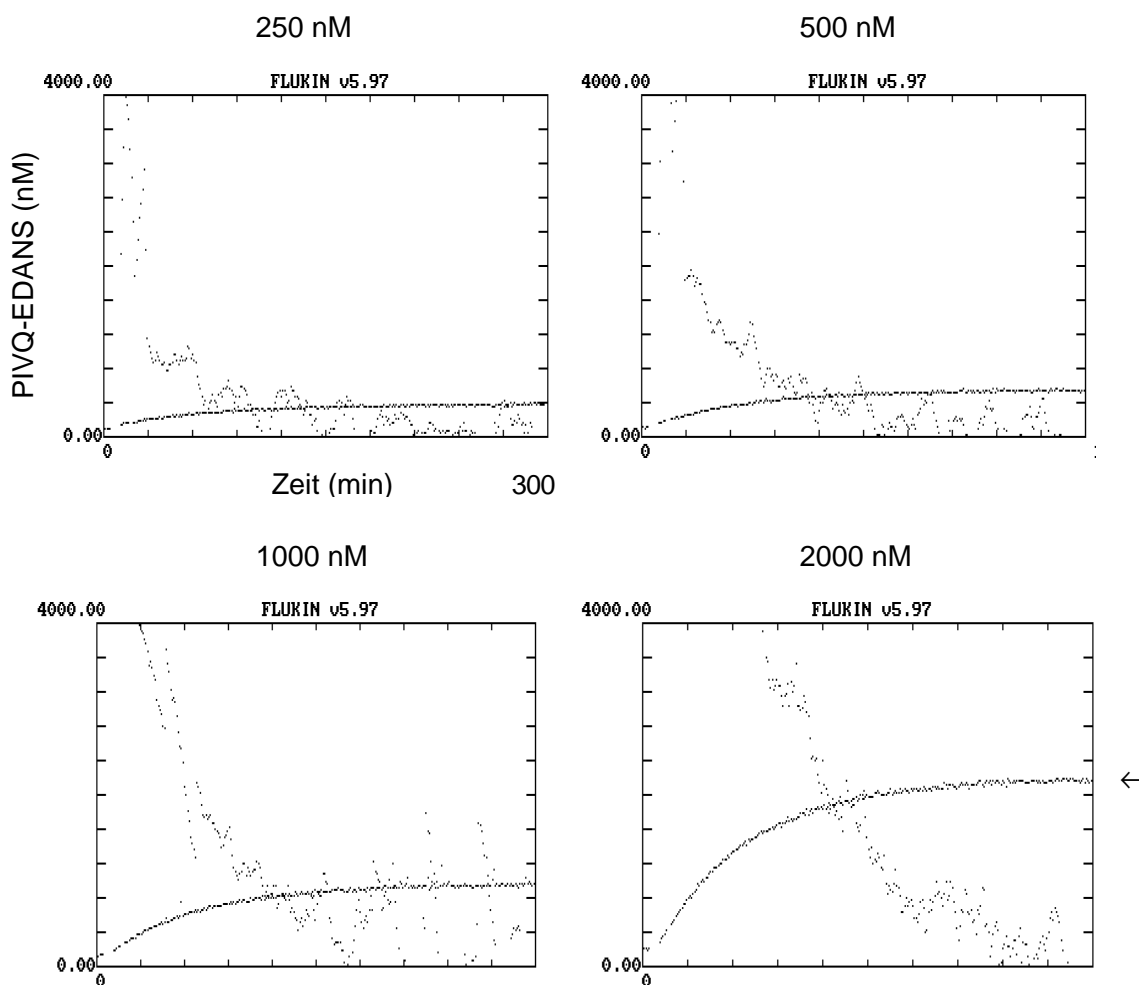


Abb. C.7. Vollständige Spaltung von Substratlösungen der Konzentrationen 250, 500, 1000 und 2000 nM. Der Messbereich wurde auf 200% eingestellt, dies entspricht einer EDANS-Konzentration von 4000 nM.

Die Spaltproduktlösung mit einer Konzentration von 2000 nM generiert ein geringfügig stärkeres Signal als die 2000 nM EDANS-Eichlösung (Pfeil). Eine Halbierung der Substratkonzentration führt zu einem ebenfalls um etwa 50% reduzierten Fluoreszenzsignal. Bei der Berechnung des Stoffumsatzes kann demnach ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzsignal und der Konzentration von PIVQ-EDANS angenommen werden.

C.1.6 Fluoreszenzsignal in Gegenwart unterschiedlicher EDANS- und Substratkonzentrationen

Bei der Bestimmung der Michaeliskonstante wird die Enzymaktivität in Gegenwart unterschiedlicher Substratkonzentrationen untersucht. Daher wurden im folgenden EDANS Eichkurven in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Fluoreszenzsubstrates erstellt.

Bei der Fluoreszenzmessung mit dem Küvettenfluorometer SM25 ist die Eichung nur mit einer einzigen Konzentration von EDANS vorgesehen.

Von der Steuerungssoftware Flucol4 wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Konzentration des Fluorophors bzw. des Spaltproduktes vorausgesetzt. Dies wurde in folgendem Experiment bestätigt:

Das Fluoreszenzsignal einer 12 μM Substratlösung wurde bei 125, 250, 500, 1000 und 2000 nM EDANS gemessen. Der gewählte Konzentrationsbereich entsprach dem Stoffumsatz bei enzymkinetischen Untersuchungen.

Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente erfolgten jeweils ohne PC-Steuerung. Als Eichlösung wurde 2000 nM EDANS in 1x Assay Puffer verwendet, die Fluoreszenzsignale aller im folgenden untersuchten Lösungen wurden als Prozentwerte der Fluoreszenz dieser Eichlösung angegeben.

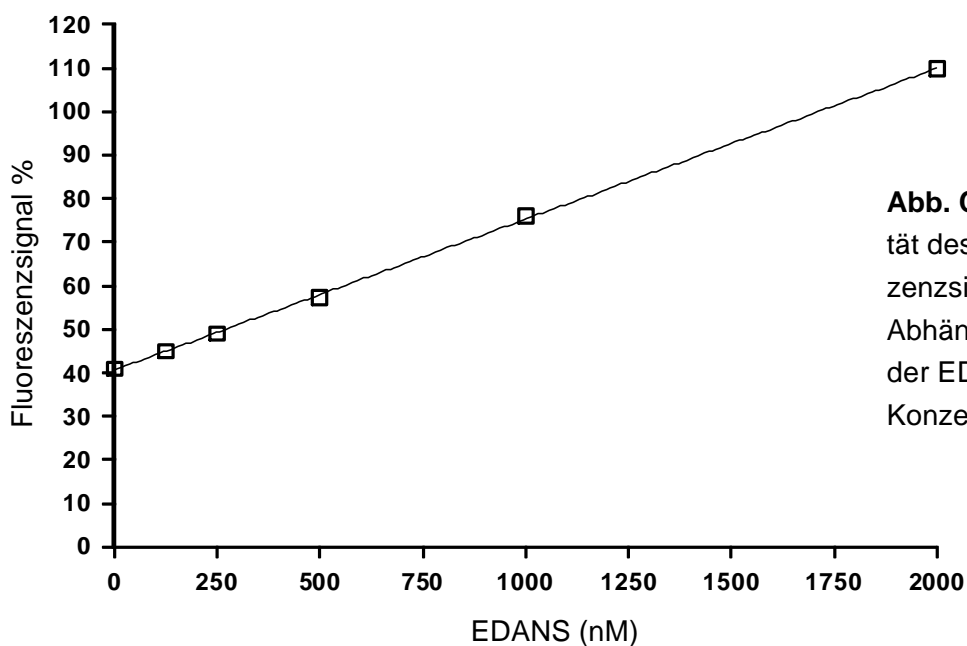


Abb. C.8. Intensität des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der EDANS-Konzentration.

Abb. C.8 zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der EDANS-Konzentration und dem Fluoreszenzsignal der Lösung. FigureP erstellt durch lineare Regression eine Gerade mit der Gleichung: $y = m \cdot x + b$

PARAMETER	VALUE	\pm SE	\pm 95,0 % CI
m	0,035	3,619e-4	0,0010
b	40,62	0,34	0,95

SE: Standardabweichung CI: Konfidenzintervall

Die Hintergrundfluoreszenz der 12 μM Substratlösung (y-Abschnitt b) beträgt ca. 40% des Gesamtsignals der 2000 nM EDANS Lösung.

Das oben beschriebene Experiment wurde zudem bei den Substratkonzentrationen 0, 6, 24, 36 und 50 μM durchgeführt, um den bei der K_m -Bestimmung verwendeten Konzentrationsbereich abzudecken.

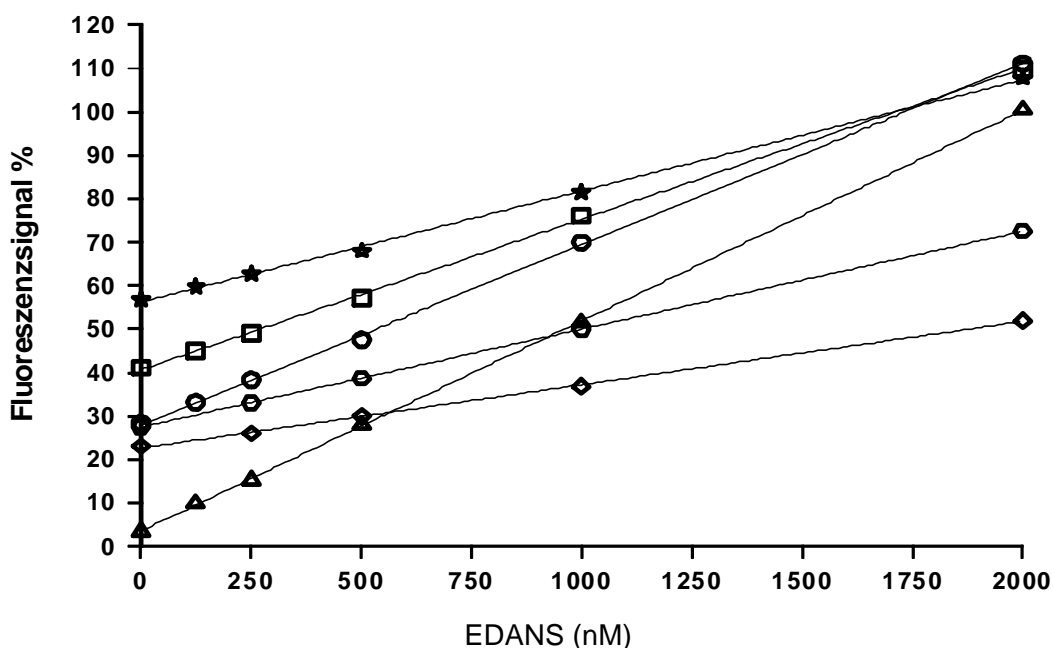


Abb. C.9. Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der EDANS-Konzentration. Messreihen bei folgenden Substratkonzentrationen (μM): 0 (Dreieck), 6 (Kreis), 12 (Quadrat), 24 (Stern), 36 (Hexagon), 50 (Raute).

Abb. C.9 zeigt, dass zunehmende Substratkonzentrationen die Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden, also die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Messbereich verringern („inner

filter effect“). Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Bei steigenden Substratkonzentrationen verkleinert sich der Abstand des Fluorophors EDANS zu DABCYL-Gruppen benachbarter Substratmoleküle. Daraus folgt eine zunehmende Hemmung des durch EDANS verursachten Fluoreszenzsignals.

C.1.7 Korrektur des „inner filter effect“

Durch die oben beschriebene Abschwächung des Fluoreszenzsignals berechnet Flukin49 für die Reaktionsgeschwindigkeiten zu niedrige Werte. Diese müssen mit von der Substratkonzentration abhängigen Korrekturfaktoren multipliziert werden, um die tatsächlichen Werte zu erhalten.

Für den Korrekturfaktor a_c für die Substratkonzentration c gilt: $a_c = m_0 / m_c$

m_0 : Steigung der Regressionsgeraden für 0 μM Substrat

m_c : Steigung der Regressionsgeraden für c μM Substrat

Substrat (μM)	0	6	12	24
a_c	1	1,16	1,40	1,89

Tab. C.1. Korrekturfaktoren (a_c) des „inner filter effect“ bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Um die Hemmwirkung des ungespaltenen Substrates auf das Fluoreszenzsignal zu berücksichtigen, müssen Fluoreszenzsignale bzw. berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten mit diesen Faktoren multipliziert werden.

Diesen Werten lässt sich wiederum durch lineare Regression eine Gerade anpassen. Die Gleichung dieser Geraden lautet: $a = 0,044 \cdot c + 0,89$

Durch Einsetzen der gewünschten Substratkonzentration erhält man den zugehörigen Korrekturfaktor.

C.2 Bestimmung der Michaelis-Konstante K_m einer WT- und einer aus Patientenmaterial exprimierten Protease

Die Michaelis-Konstante K_m entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der der Substratumsatz bei konstanter Enzymkonzentration den halbmaximalen Wert annimmt. Sie ist somit ein Maß für die Affinität von Enzym zu Substrat.

Zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration besteht folgender Zusammenhang:

$$v = v_{\max} \cdot [S]/(K_m + [S]) \quad (\text{Gl. C.1})$$

Nach der Formel $K_{iapp} = K_i (1 + [S]/K_m)$ sind aus der allgemeinen Gleichung für festbindende Inhibitoren berechnete scheinbare K_{iapp} nur dann eine gute Annäherung für die tatsächlichen K_i , wenn die verwendete Substratkonzentration deutlich unter der Michaeliskonstante liegt (B.12). Um dies zu überprüfen, wurden die K_m einer WT PR und einer aus Patientenmaterial erhaltenen Protease bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen. Durch die eingeschränkte Löslichkeit des Fluoreszenzsubstrates im Assay Puffer konnte es nur in einer maximalen Konzentration von 50-60 μM Substrat eingesetzt werden.

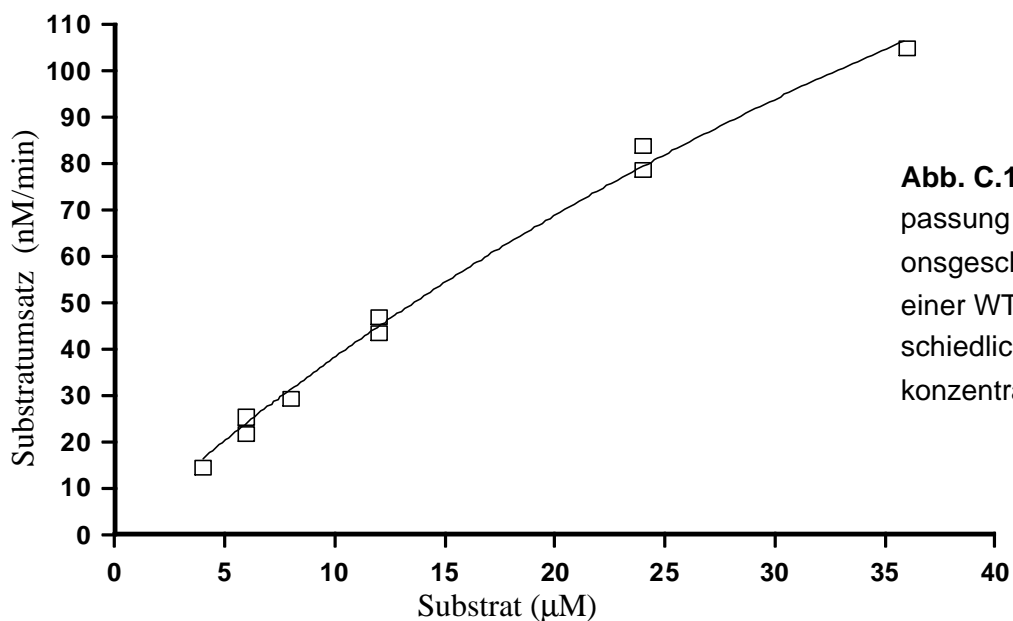


Abb. C.10. Kurvenanpassung der Reaktionsgeschwindigkeiten einer WT PR bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Da besonders höhere Substratkonzentrationen das Fluoreszenzsignal hemmen, war eine Korrektur dieses „inner filter effect“ notwendig (C.1.7).

Die Kurvenanpassung durch nichtlineare Regression erfolgte mit FigureP unter Verwendung der Gleichung C.1.

Die Substratkonzentration [S] und die zugehörige gemessene Reaktionsgeschwindigkeit v wurden als Messdaten eingegeben. Die Parameter K_m und v_{max} wurden bei der Kurvenanpassung bestimmt:

PARAMETER	VALUE	\pm SE	\pm 95,0% CI
K_m	80,32	5,81	37,38
v_{max}	344,80	52,15	123,32

Die hier erhaltene Michaeliskonstante von 80,3 μM für WT-HIV PR (Abb. C.10) stimmt gut mit den Literaturangaben von 103,2 μM (Matayoshi et al., 1990) überein.

Zusätzlich wurde die Michaeliskonstante der aus Patientenmaterial 3 exprimierten HIV PR ermittelt (Abb. C.11).

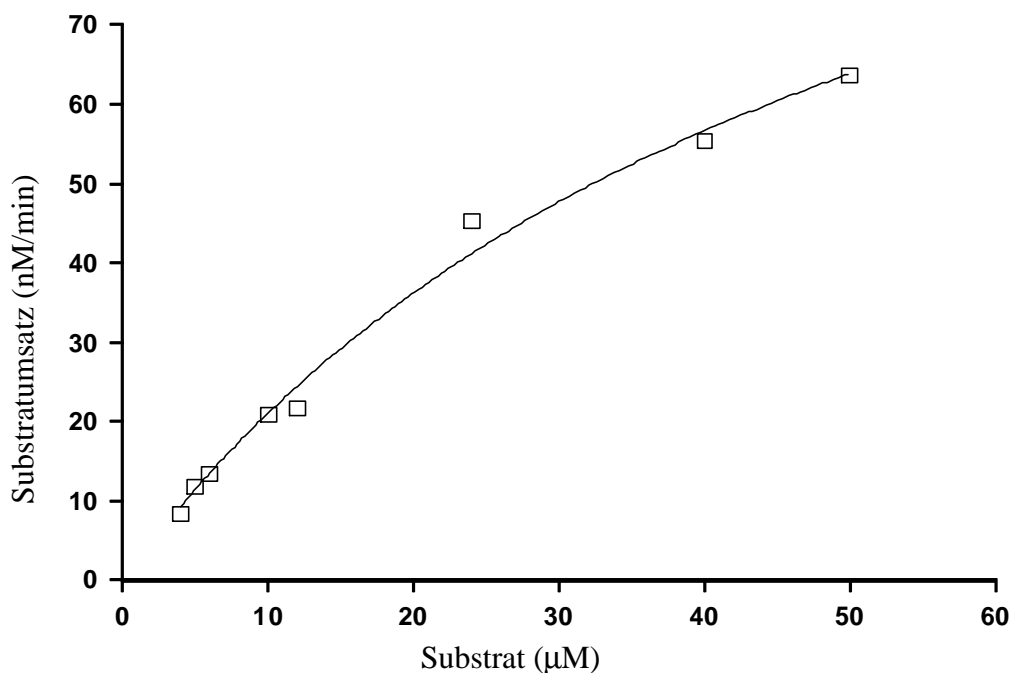


Abb. C.11. Kurvenanpassung für die bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten einer Patienten PR.

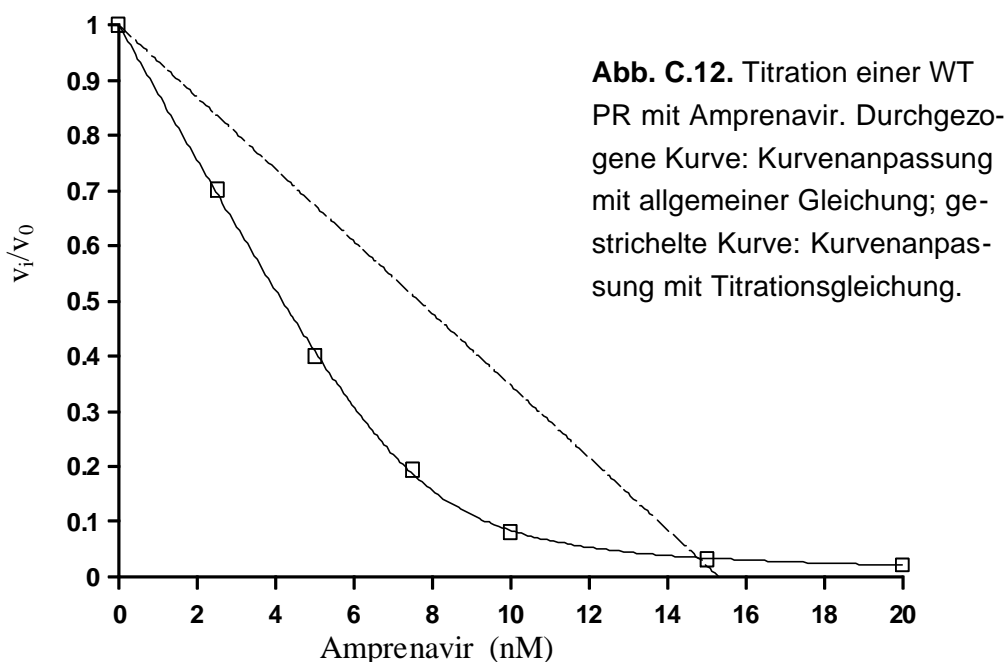
Die Berechnung der K_i hatte bei dieser Protease besonders deutliche Hinweise auf eine niedrige Enzymkonzentration und damit hohe spezifische Aktivität gegeben. Deshalb würde man hier eine vergleichsweise niedrige K_m erwarten.

PARAMETER	VALUE	\pm SE	\pm 95,0 % CI
K_m	51,93	9,57	23,41
v_{max}	130,24	14,68	35,93

Die Michaeliskonstante liegt hier um fast 50% niedriger als die der WT Protease. Dies passt zu einer hohen spezifischen Aktivität und einer daraus resultierenden niedrigen Enzymkonzentration im Fluoreszenzassay unter Gleichgewichtsbedingungen.

C.3 Titration des aktiven Zentrums der HIV Protease

Die Bestimmung der Konzentration aktiver HIV Protease wurde für WT, Roche-Mutante und 5 Patientenproben mittels Titration des aktiven Zentrums exemplarisch durchgeführt. In Abb. C.12 wird die Kurvenanpassung unter Verwendung der allgemeinen Gleichung für festbindende Inhibitoren und der Titrationsgleichung dargestellt. Die Messpunkte zeigen keinen linearen Verlauf, es liegen trotz der hohen eingesetzten PR Konzentration keine reinen Titrationsbedingungen vor. Deshalb wurde zur Auswertung die allgemeine Gleichung für festbindende Inhibitoren (Gl B.2) verwendet.



HIV PR	Stoffumsatz v_0 (nM/min)	Proteasekonzentration E_{tT} (nM)	E_{tT}/v_0
WT	259	11,1	0,043
Ro-Mutante	254	33,2	0,136
Patient 4	485	9,2	0,019
Patient 7	706	12,7	0,018
Patient 8	585	10,2	0,018
Patient 6a	303	7,8	0,026
Patient 6b	531	13,6	0,025

Tab. C.2. Ungehemmte Reaktionsgeschwindigkeiten v_0 und zugehörige, durch Titration bestimmte Enzymkonzentrationen E_{tT} im Gesamtansatz. Der Quotient E_{tT}/v_0 ist ein Maß für die spezifische Aktivität einer PR. Je kleiner der Quotient, umso höher ist die spezifische Aktivität, d. h. desto weniger Enzym muss eingesetzt werden, um eine bestimmte Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

Die Roche-Mutante (G48V, I54V, L90M) hat gegenüber den anderen untersuchten Proteasen die geringste spezifische Aktivität. Bei hochresistenten Proteasen werden auch in der Literatur vergleichsweise niedrige katalytische Konstanten (k_{cat}/K_m) angegeben (Ermolieff et al., 1997; Klabe et al., 1998).

Die untersuchten, phänotypisch vorwiegend niedrig resistenten Patienten haben unter den Assaybedingungen ähnliche, jedoch etwas höhere spezifische Aktivitäten als die WT PR. Patient 6a und 6b wurden durch unterschiedliche Aufarbeitungen aus demselben Material hergestellt, hier ist deshalb die Übereinstimmung erwartungsgemäß sehr gut.

Zusammengefasst ist aus den Ergebnissen zu entnehmen, dass niedrig und intermediär resistente Proteasen vergleichbare spezifische Aktivitäten aufweisen und deshalb die zur K_i -Bestimmung eingesetzten PR-Konzentrationen ebenfalls ähnlich sind.

Die durch Titration erhaltenen Enzymkonzentrationen wurden in Kapitel C.4 für die Berechnung der K_i verwendet.

C.4 Auswertung der in Küvetten gemessenen HIV Proteasen

Durch Titration des aktiven Zentrums konnte die bei der K_i -Bestimmung verwendete PR-Konzentration E_t berechnet werden (Tab. C.2):

$$E_t = E_{tT} / v_T * v_0$$

E_{tT} = Zur Titration eingesetzte Gesamtkonzentration aktiven Enzyms

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit bei K_i -Bestimmung

v_T = Reaktionsgeschwindigkeit bei Titration

Die Konzentrationen an aktiver PR lagen bei angestrebtem Stoffumsatz von 10-20 nM/min in der gleichen Größenordnung wie die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen. Nach Morrison (1982) (Tab. B.1) eignet sich in diesem Fall die allgemeine Gleichung für festbindende Inhibitoren zur Auswertung (Gl. B.2).

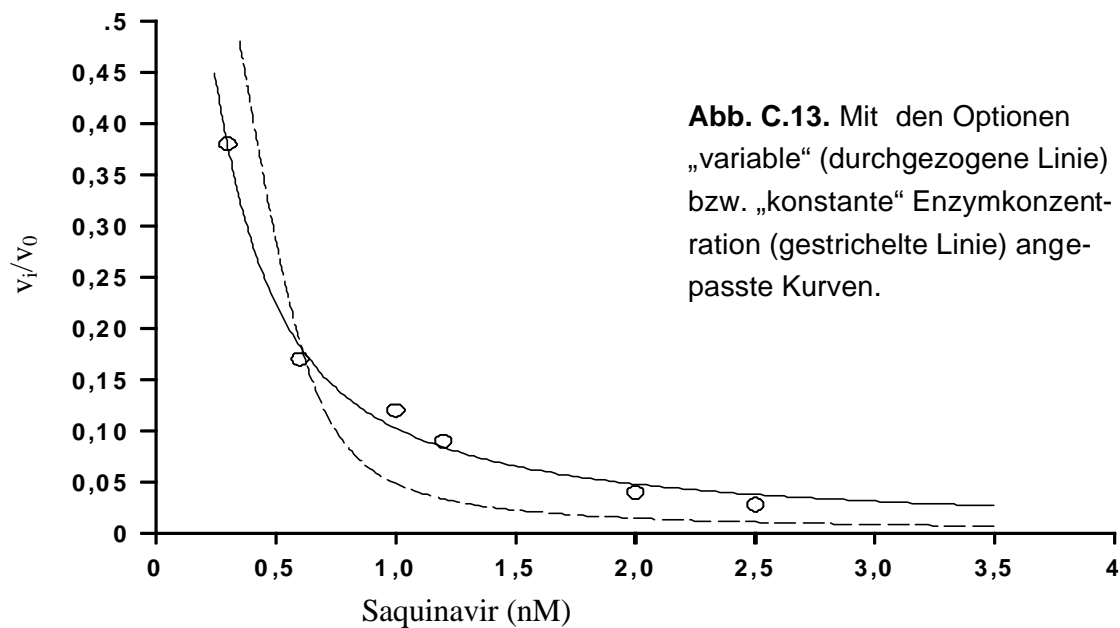
Wie schon in B.13 erwähnt, kann FigureP Kurvenanpassungen sowohl mit fest vorgegebener als auch mit variabler Enzymkonzentration durchführen.

Bei im Küvettenformat gemessenen Werten ergab die Option „variable Enzymkonzentration“ gut angepasste Kurven. Dabei nahm E_t häufig sehr kleine Werte an. Die große Standardabweichung zeigt, dass sich E_t aus den Messwerten nicht verlässlich bestimmen lässt. Eine genauere enzymatische Auswertung gelingt durch Ermittlung der spezifischen Aktivität mittels Titration (s. oben). Die resultierende PR-Konzentration E_t wird bei der Bestimmung der K_i mit der Option „konstante Enzymkonzentration“ verwendet.

Bei der Betrachtung der Messwerte fällt auf, dass v_T/v_0 bei geringen PI-Konzentrationen häufig vergleichsweise niedrig liegt. Dies führt, wie im folgenden gezeigt wird, bei der Regression mit Gleichung B.2 zu unrealistisch kleinen Enzymkonzentrationen.

Die in Abb. C.13 dargestellten Messwerte einer Patienten PR mit Saquinavir verdeutlichen diesen Sachverhalt.

Die Option „variable Enzymkonzentration“ ergibt eine den Messpunkten besser angepasste Kurve als die Option „konstante Enzymkonzentration“.

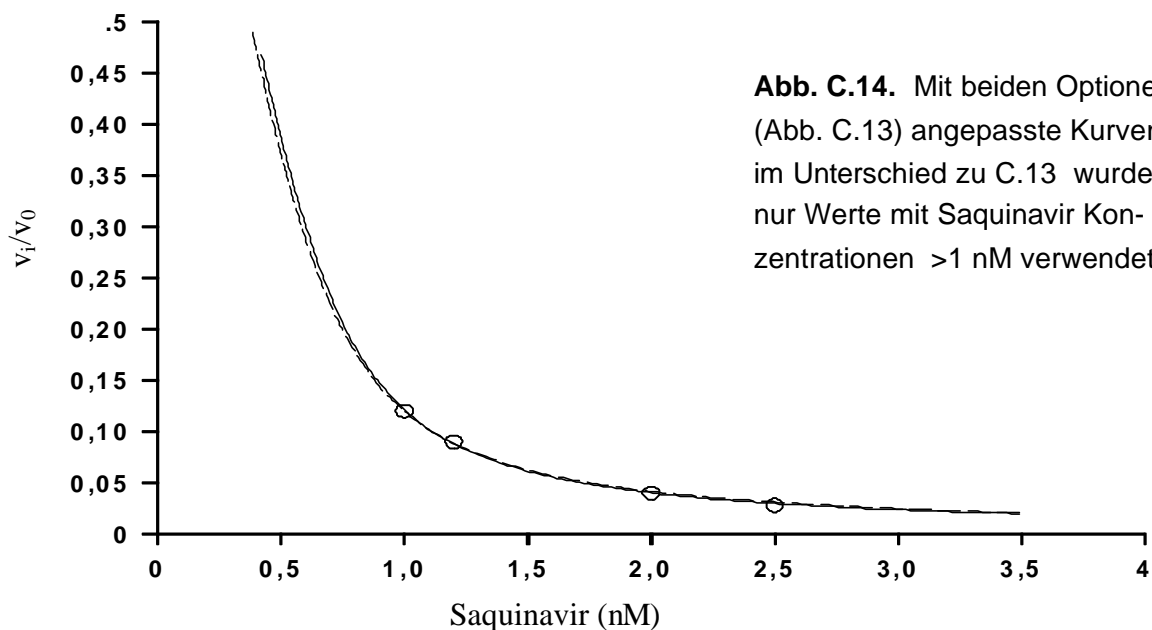


Die durch beide Berechnungsarten erhaltenen K_i unterscheiden sich deutlich:

E_t variabel : $K_i = 0,089 \pm 0,010$

E_t fest: $E_t = 0,630$ nM (aus Titration): $K_i = 0,020 \pm 0,019$

Zieht man bei der Kurvenanpassung nur stark inhibierte Messwerte mit höherer Saquinavir-Konzentration (ab 1 nM) in Betracht, so erhält man mit beiden Berechnungsoptionen fast deckungsgleiche Kurven (Abb. C.14; E_t konstant: Durchgezogene Kurve; E_t variabel: Gestrichelte Kurve)



Die K_i sind sehr ähnlich:

$$E_t \text{ variabel : } K_i = 0,057 \pm 0,034$$

$$E_t \text{ fest: } E_t = 0,630 \text{ nM (aus Titration): } K_i = 0,060 \pm 0,011$$

Eine mögliche Erklärung der offensichtlich zu niedrig gemessenen v_i/v_0 im unteren Konzentrationsbereich der PI liegt in der Art der Versuchsdurchführung: In jeder Küvette wurde die Reaktion zunächst mit Protease gestartet und v_0 bestimmt, die PI-Zugabe erfolgte später. Die Unterbrechung der Messung mit Zugabe eines Flüssigkeitsvolumens hat, unabhängig von der Wirkung des PI selbst, eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. Diese Abnahme macht sich bei denjenigen Proben besonders bemerkbar, die nur einer geringen „spezifischen“ Inhibition durch den PI unterliegen.

Bei der Auswertung von Kurven, bei denen die Regression sehr kleine, unrealistische Proteasekonzentrationen lieferte, wurden in der anschließenden Auswertung nur $v_i/v_0 < 0,4$ verwendet, außerdem wurden nicht gut anpassbare Messwerte unberücksichtigt gelassen. Bei so ausgewerteten Inhibitionskurven stimmten mit konstanter und variabler Enzymkonzentration erhaltene K_i gut überein, wie die folgende Tabelle zeigt:

PI	K_i WT PR		K_i PR-Patient 4		K_i PR-Patient 7	
	E_t konstant	E_t variabel	E_t konstant	E_t variabel	E_t konstant	E_t variabel
Amp	$0,15 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,14$	$0,74 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,17$	$0,59 \pm 0,07$	$0,51 \pm 0,18$
Ind	$0,13 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,11$	$0,58 \pm 0,12$
Nel	$0,21 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,16$	$1,1 \pm 0,18$
Rit	$0,13 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,07$
Saq	$0,065 \pm 0,005$	$0,065 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,025$	$0,16 \pm 0,06$

Tab. C.3. Vergleich der K_i bei Berechnung durch die Optionen „ E_t konstant“ und „ E_t variabel“ und Verwendung ausschließlich stark inhibierter Werte.

C.5 Untersuchung der Wildtyp HIV Protease im Küvettenformat

Die WT PR wurde neben der Etablierung der Bedingungen für den Fluoreszenztest auch aus anderen Gründen enzymkinetisch besonders genau untersucht: Zum einen kann die Validität des Testes durch Vergleich der hier ermittelten K_i mit Literaturwerten, die durch andere Testsysteme erhalten wurden, überprüft werden. Andererseits ist die möglichst genaue Bestimmung der K_i für WT PR unter den besonderen Bedingungen dieses Tests notwendig, da sie für die Berechnung der Resistenzfaktoren jedes Patienten verwendet werden. Um die Genauigkeit der Bestimmung der K_i zu erhöhen, wurden jeweils 15-30 Messpunkte aus unterschiedlichen Versuchsansätzen für die Berechnung verwendet.

Zudem wurde untersucht, ob eine zusätzliche Reinigung der WT PR nach der vereinfachten Enzympräparation einen Einfluss auf die Inhibitionskonstanten hat. Dies wäre z. B. dann der Fall, wenn dadurch *E. coli* Proteasen mit intrinsischer Aktivität entfernt würden.

Bei der Anreicherung der HIV PR wurde ihre Hydrophobizität ausgenutzt: Die durch Ammoniumsulfat gefällten Proteine wurden in 300-500 μ l 1x Assay Puffer ohne DMSO 30 min auf Eis unter mehrmaligem gründlichem Mischen inkubiert. Die Suspensionen aus 5 Ansätzen wurden vereinigt und zentrifugiert. Der Großteil der hydrophilen Proteine geht dabei in Lösung, die HIV PR und andere hydrophobe Proteine reichern sich im Sediment an. Dieses wurde mit 4 ml 1x Assay Puffer mit 10% DMSO versetzt und 5 h auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation wurde die Elution wiederholt, die Überstände aus beiden Elutionen vereinigt und das Lösungsvolumen mit Hilfe von Centricon Einwegkonzentrator eingengt.

Abb. C.15 zeigt den deutlich höheren, relativen HIV Proteasegehalt nach dieser Behandlung. Zum Nachweis, dass es sich bei den bezeichneten Banden um die HIV-1 PR handelt, dient der Western Blot (C.15.b).

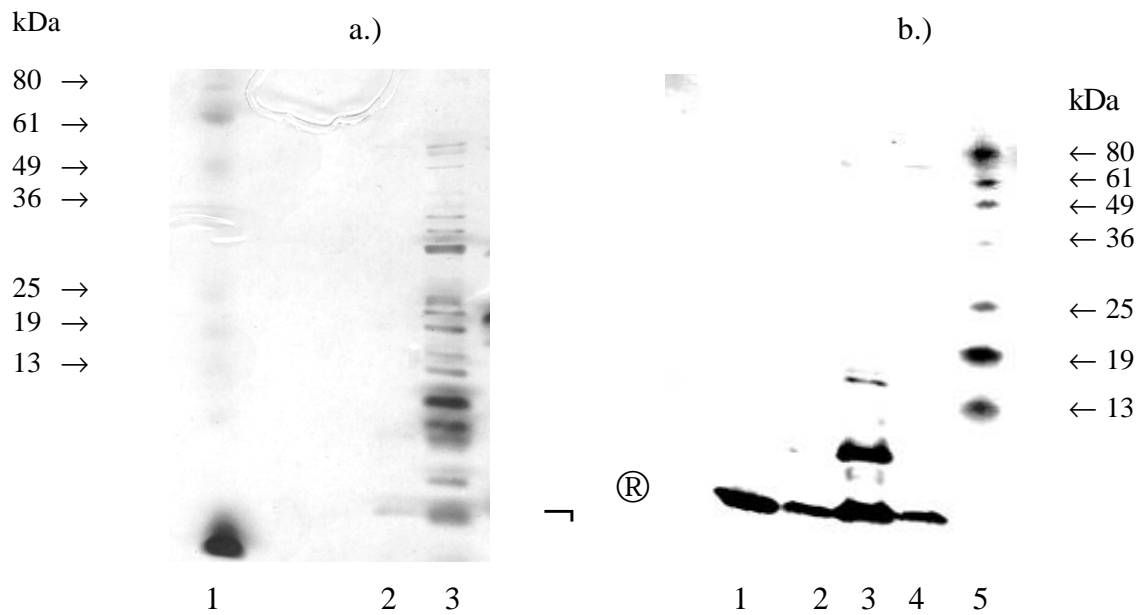


Abb. C.15.

- a.) Silbergefärbtes SDS-Gel: **(1)** Proteinmarker; **(2)** angereicherte WT Protease; **(3)** WT Protease wie in **(2)**, vereinfachte Enzympräparation;
- b.) Western Blot: **(1)** mit RPC gereinigte HIV Protease; **(2)** angereicherte WT Protease; **(3)** WT Protease wie in **(2)**, vereinfachte Enzympräparation; **(4)** „Roche“- Mutante; **(5)** Proteinmarker

Die Position der HIV-1 Protease ist jeweils durch Pfeile markiert.

WT Proteasen aus vereinfachter Enzympräparation ergeben trotz höherem Gehalt an Fremdproteinen Inhibitionskonstanten, die gut mit Werten der aufgereinigten Protease übereinstimmen (Tab. C.4). Diese wichtige Beobachtung zeigt, dass der Fluoreszenztest durch andere, aus *E. coli* stammende Proteine praktisch nicht beeinflusst wird. Offensichtlich weisen *E. coli* Proteinasen mit dem verwendeten Substrat so gut wie keine intrinsische Aktivität auf.

	WT gereinigt	WT vereinfachte Enzympräparation	Daten aus der Literatur (Klabe et al., Biochemistry, 37 , 1998)
PI	K_i^K [nM]	K_i^K [nM]	K_i [nM]
Amp	$0,21 \pm 0,049$	$0,19 \pm 0,10$	nicht verfügbar
Ind	$0,16 \pm 0,028$	$0,29 \pm 0,075$	0,14
Nel	$0,38 \pm 0,032$	$0,37 \pm 0,046$	0,28
Rit	$0,16 \pm 0,035$	$0,16 \pm 0,023$	0,17
Saq	$0,066 \pm 0,011$	$0,11 \pm 0,089$	0,15

Tab. C.4. Inhibitionskonstanten der WT Protease abhängig von ihrer Vorbehandlung im Vergleich zu Werten aus der Literatur. K_i^K : Im Küvettenformat ermittelte Inhibitionskonstanten.

Für die Berechnung der Resistenzfaktoren der im Küvettenformat gemessenen Patienten wurden die mit gereinigter PR bestimmten WT K_i verwendet, da sie aus 20-30 Messpunkten gewonnen wurden und somit eine hohe Genauigkeit der Werte gewährleisten.

C.6 Messung von Patientenproteasen im Küvettenformat

Nach der Bestimmung der K_i der WT PR für die 5 PI sollte geprüft werden, ob der enzymkinetische Fluoreszenztest auch bei Messung von aus Patientenmaterial rekombinant exprimierten HIV PR reproduzierbare und valide Daten liefert. Daher wurden vor Transfer in das Mikrotiterplattenformat 7 solche Proteasen im Küvettenformat untersucht. Dabei wurden sowohl sensitive als auch intermediär- und hochresistente PR getestet.

C.6.1 Kinetische Analyse 3 hochresistenter, aus Patientenmaterial exprimierter Proteasen

Die Messung sollte prüfen, ob die durch zahlreiche Aminosäureaustausche veränderten Proteasen unter den zunächst für WT PR etablierten Bedingungen des Fluoreszenztests ebenfalls reproduzierbare, valide Resistenzdaten liefern.

Die Patienten PR waren bereits zuvor rekombinant exprimiert und geno- und phänotypisch mit RPC untersucht worden (Gehring 2001). Die Benennung der Patientenproben stammt aus einer laborinternen Katalogisierung und wurde hier beibehalten.

Die vorliegenden Resistenzdaten wurden durch gemeinsame Auswertung mehrerer Versuchsansätze, die an unterschiedlichen Tagen gemessen wurden, ermittelt (Tab. C.5). Die relativ geringe Standardabweichung verdeutlicht die gute Reproduzierbarkeit der Messwerte. Die Proteasen zeigten im Enzymtest stabile Aktivität, die eingesetzten PI wirken als kompetitive, festbindende Inhibitoren. Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexes ließen sich deshalb problemlos berechnen, sie lagen meist um ein bis zwei Zehnerpotenzen über den Werten für die WT PR. Die im Fluoreszenzassay bestimmten Resistenzfaktoren zeigen innerhalb der untersuchten Proben ein gleichartiges Verhalten wie die entsprechenden Daten aus RPC- und genotypischer Auswertung. Genotypische Resistenzfaktoren >10 werden nicht weiter differenziert.

Die Auswertung im Fluoreszenztest hingegen erlaubt auch gegenüber der RPC Analyse eine bessere Differenzierung der Resistenzfaktoren.

	Patient 38 (12 Aminosäureaustausche)				Patient 66 (15 Aminosäureaustausche)			
PI	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}
Amp	$0,34 \pm 0,15$	1,6	1	2	$0,64 \pm 0,22$	3,1	1	2
Ind	$2,9 \pm 0,67$	12	3	>10	$2,3 \pm 0,53$	15	6	10
Nel	$6,5 \pm 0,79$	21	10	>10	$11,6 \pm 1,4$	37	3	10
Rit	$2,8 \pm 0,57$	17	12	8	$7,9 \pm 0,7$	48	6	10
Saq	$19,7 \pm 7,1$	298	1000	>10	$3,8 \pm 1,7$	58	10	10
	Patient 202 (12 Aminosäureaustausche)							
PI	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}				
Amp	$1,3 \pm 0,4$	6,2	2	4				
Ind	$11,0 \pm 2,0$	71	10	>10				
Nel	$16,6 \pm 1,3$	52	3	>10				
Rit	$5,1 \pm 1,1$	31	10	>10				
Saq	$17,5 \pm 1,6$	265	100	>10				

Tab. C.5. Im Küvettenformat ermittelte Dissoziationskonstanten von 3 hochresistenten Patienten PR K_i^K und daraus berechnete Resistenzfaktoren $R_{\text{Fluoreszenz}}$. Zum Vergleich sind mittels RPC und genotypisch ermittelte Resistenzfaktoren angegeben. Genotypische Resistenzfaktoren >10 werden nicht weiter differenziert.

Aminosäureaustausche

Patient 38: L10I, S37N, I54L, D60E, L63P, I64V, A71V, G37S, V77I, I84V, L90M, I93L

Patient 66: K20R, E35D, M36I, S37N, M46L, R57K, I62V, L63P, A71V, I72R, G73S, V77I, V82I, L90M, I93L

Patient 202: L10I, V11I, E35D, S37N, M46I, L63P, H69R, A71V, G73T, I84V, L90M, I93L

Insgesamt zeigte sich bei der Untersuchung dieser 3 hochresistenten Patienten, dass sich selbst aus mutationsreichen PR-Genen ausgehend von Patientenmaterial mit dem verwendeten Expressionssystem enzymatisch aktive und im Fluoreszenztest auswertbare PR gewinnen lässt.

C.6.2 Untersuchung genotypisch intermediär resistenter bzw. sensitiver HIV PR aus Patientenmaterial

Die in dieser Versuchsreihe gemessenen Proteasen wurden unter Verwendung des „nested PCR“-Protokolls amplifiziert (B.5.5). Sie weisen weniger resistenzverursachende Mutationen auf, demnach waren gegenüber der hochresistenten Patientengruppe niedrigere Resistenzfaktoren zu erwarten. Die Untersuchung dieser PR sollte die Sensitivität des Assays unter folgenden Gesichtspunkten überprüfen:

- Wird niedriggradige Resistenz erkannt?
- Kann reproduzierbar zwischen niedrigen Resistenzfaktoren differenziert werden?

Die Daten in Tab. C.6 zeigen, dass der phänotypische Resistenztest bei Auswertung mit dem Fluoreszenzassay auch niedriggradige Resistenzen der HIV PR detektiert. Gegenüber genotypischer Resistenzbestimmung liefert der Fluoreszenztest höhere Resistenzfaktoren, eine höhere Nachweisempfindlichkeit geringgradiger Resistenzen ist deshalb zu erwarten.

	Patient 4 (4 Aminosäureaustausche)			Patient 6 (2 Aminosäureaustausche)		
PI	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{Genotyp}	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{Genotyp}
Amp	0,88 ± 0,17	4,2	2	0,33 ± 0,11	1,5	1
Ind	0,58 ± 0,048	3,4	2	0,33 ± 0,05	1,9	1
Nel	1,5 ± 0,18	5	3	0,57 ± 0,065	1,9	1
Rit	0,79 ± 0,12	4,0	2	0,32 ± 0,074	1,6	1
Saq	0,57 ± 0,078	8,2	3	0,057 ± 0,03	0,88	1

	Patient 7 (2 Aminosäureaustausche)			Patient 8 (2 Aminosäureaustausche)		
PI	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{Genotyp}	K_i^K [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{Genotyp}
Amp	0,51 ± 0,18	2,3	1	0,56 ± 0,08	2,5	1
Ind	0,58 ± 0,12	3,4	1	0,67 ± 0,09	3,9	1
Nel	1,09 ± 0,18	3,6	1	0,82 ± 0,07	2,7	1
Rit	0,39 ± 0,07	2,0	1	0,55 ± 0,23	2,8	1
Saq	0,16 ± 0,063	2,5	1	0,29 ± 0,10	4,5	1

Tab. C.6. Inhibitionskonstanten (K_i^K) und daraus berechnete Resistenzfaktoren $R_{\text{Fluoreszenz}}$ von 4 niedrig resistenten bzw. sensitiven Patienten PR. Zum Vergleich sind genotypische Resistenzfaktoren angeführt.

Aminosäureaustausche:

Patient 4: M36I/M, L63P, V77I, L90M

Patient 6: K20M, M36I

Patient 7: L63S, V77I

Patient 8: L63 S, V77I

In Abb. C.14 ist die gute Übereinstimmung zwischen phäno- und genotypischen Resistenzfaktoren graphisch dargestellt, die phänotypischen Faktoren liegen dabei wie erwartet, in einem höheren Bereich (D.4.2).

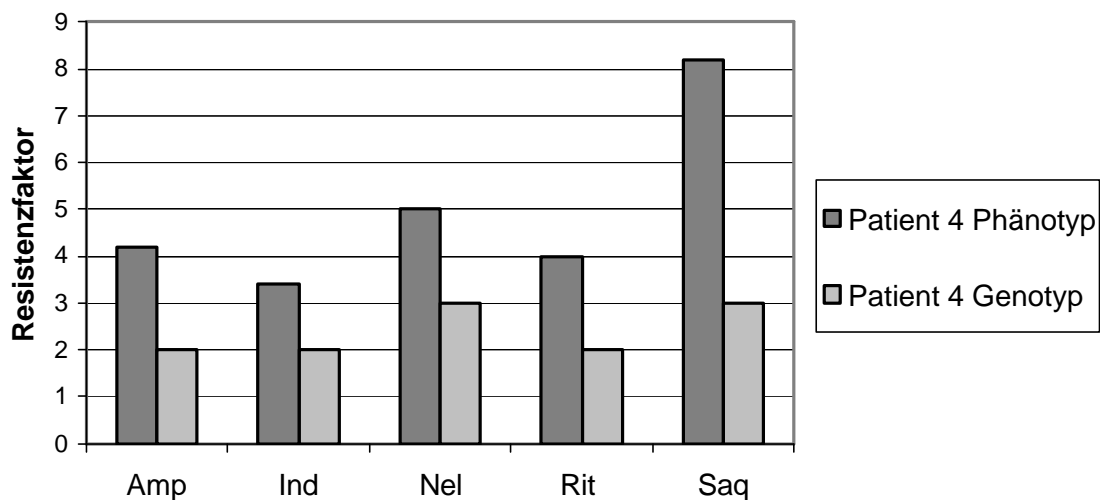


Abb. C.16. Graphische Darstellung der genotypischen und phänotypischen Resistenzfaktoren im Vergleich.

C.7 Fluoreszenzmessungen im Mikrotiterplattenformat

Ergebnisse aus Messungen im Küvettenformat hatten gezeigt, dass der etablierte Fluoreszenztest sowohl für WT als auch für Proteasen aus Patientenmaterial reproduzierbare Daten liefert. Die Validität der Ergebnisse war durch Vergleich mit Literaturdaten und genotypischen Resistenzfaktoren geprüft worden. Das Küvettenformat ist jedoch für Routinediagnostik wegen des Zeitaufwands nicht geeignet. Um einen hohen Probendurchsatz bei gleichzeitig reduziertem Arbeitsaufwand zu erreichen, wurde der Fluoreszenztest auf 96-Well Mikrotiterplattenformat übertragen. Dabei blieben die Testbedingungen sowie die Zusammensetzung der Reaktionslösung weitgehend unverändert.

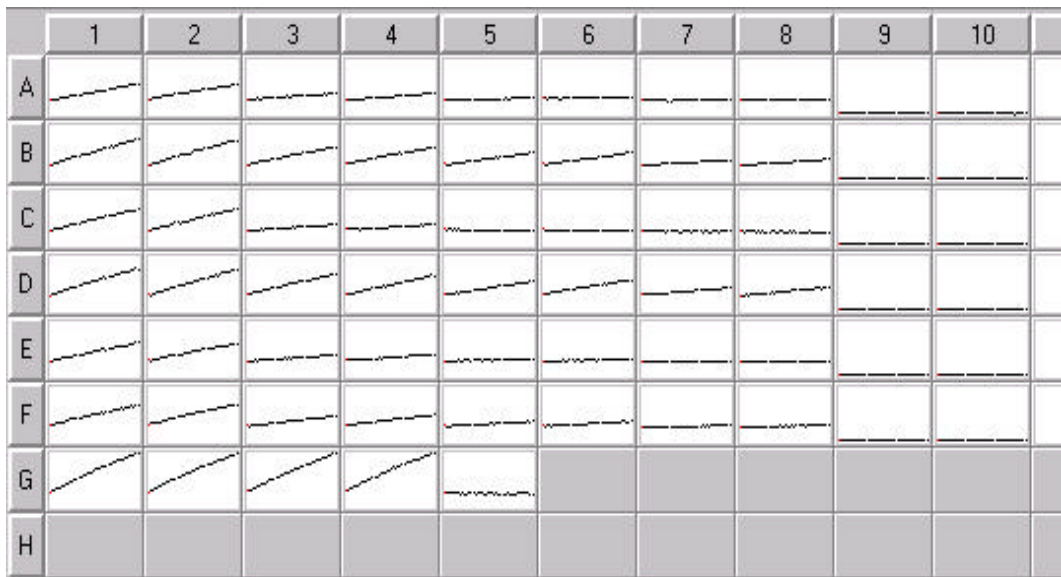


Abb. C.17. Graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsmessung einer HIV PR in Gegenwart von 6 PI (Reihe A-F). Jede PI Konzentration wurde im Doppelansatz untersucht (Spalte 1 und 2, 3 und 4 usw.). Der ungehemmte Substratumsatz wurde in den Wells G1-G4 bestimmt (Abb. B.1).

Analog zur Testetablierung im Küvettenformat wurden zunächst die Dissoziationskonstanten der WT PR und der therapeutisch eingesetzten PI bestimmt. Dadurch wurde die Vergleichbarkeit der Werte in beiden Formaten überprüft. Außerdem sollte die Berechnung der Resistenzfaktoren mit WT-Inhibitionskonstanten aus dem gleichen Format erfolgen. Anschließend wurden PR mit unterschiedlich ausgeprägter genotypischer Resistenz untersucht.

C.8 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für WT PR und therapeutisch eingesetzte PI

Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurden für die Ermittlung der K_i jeweils 10-20 Messpunkte ausgewertet. Die WT PR wurde durch vereinfachte Enzympräparation gewonnen. Die in Mikrotiterplatten- und Küvettenformat ermittelten K_i zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Unabhängigkeit der Werte vom Testformat spricht einerseits für ihre Validität, andererseits dafür, dass der Fluoreszenzassay ohne Änderung der Testbedingungen in Mikrotiterplattenformat übertragen werden kann

	Mikrotiterplatte	Küvette
PI	K_i^M [nM]	K_i^K [nM]
Amp	$0,24 \pm 0,13$	$0,21 \pm 0,049$
Ind	$0,15 \pm 0,056$	$0,16 \pm 0,028$
Nel	$0,36 \pm 0,146$	$0,38 \pm 0,032$
Rit	$0,17 \pm 0,085$	$0,16 \pm 0,035$
Saq	$0,085 \pm 0,045$	$0,066 \pm 0,011$

Tab. C.7. Vergleich der Inhibitionskonstanten der WT PR in Mikrotiterplatten- (K_i^M) und Küvettenformat (K_i^K).

C.9 Untersuchung von aus Patientenmaterial exprimierten Proteasen im Mikrotiterplattenformat

Die hier untersuchten 7 Patienten PR wurden unter Verwendung des „single PCR“ Protokolls (B.5.4) hergestellt.

C.9.1 Messung von 3 hochresistenten Proteasen aus Patientenmaterial

Nach Messung der WT PR wurden wie im Küvettenformat genotypisch als hochresistent klassifizierte Proteasen mit zahlreichen Mutationen untersucht. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden 3 der im Küvettenformat untersuchten PR auch in Mikrotiterplatten getestet (Tab. C.11).

	Patient 38 (12 Aminosäureaustausche)				Patient 66 (15 Aminosäureaustausche)			
PI	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}
Amp	$1,7 \pm 0,48$	7	1	2	$2,1 \pm 0,81$	8,7	1	2
Ind	$4,7 \pm 0,69$	30	3	>10	$5,9 \pm 0,72$	39	6	10
Nel	$14 \pm 5,4$	39	10	>10	$36 \pm 2,7$	99	3	10
Rit	$5,8 \pm 1,9$	35	12	8	$15 \pm 1,0$	89	6	10
Saq	81 ± 85	953	1000	>10	$12 \pm 1,3$	142	10	10

	Patient 202 (12 Aminosäureaustausche)				Patient 205 (12 Aminosäureaustausche)			
PI	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}
Amp	$2,7 \pm 0,60$	11	10	4	$10,4 \pm 1,8$	43,3	N. d.	6
Ind	$5,9 \pm 0,63$	39	3	>10	$51,4 \pm 8,2$	343	60	>10
Nel	$14,3 \pm 3,1$	40	10	>10	$143 \pm 15,8$	397	10	>10
Rit	$7,6 \pm 1,2$	45	100	>10	$47,2 \pm 11,4$	295	12	>10
Saq	$14,9 \pm 3,4$	175	269	>10	$226 \pm 46,0$	2658	100	>10

Tab. C.8. K_i und daraus berechnete Resistenzfaktoren ($R_{\text{Fluoreszenz}}$) von 4 hochresistenten Patientenproteasen. Zum Vergleich sind jeweils die Werte aus RPC-Messung (R_{RPC}) sowie Genotypisierung (R_{Genotyp}) angeführt.

N. d.: Nicht durchgeführt

Aminosäureaustausche:

Patient 38: L10I, S37N, I54L, D60E, L63P, I64V, A71V, G37S, V77I, I84V, L90M, I93L

Patient 66: K20R, E35D, M36I, S37N, M46L, R57K, I62V, L63P, A71V, I72R, G73S, V77I, V82I, L90M, I93L

Patient 202: L10I, V11I, E35D, S37N, M46I, L63P, H69R, A71V, G73T, I84V, L90M, I93L

Patient 205: L10I, I15V, K20V, S37N, M46I, I62V, L63P, A71T, G73S, I84V, I85V, L90M

Die Daten in Tabelle C.8 verdeutlichen den größeren Messbereich der Fluoreszenzmessung im Vergleich zur RPC. Dies erlaubt eine genaue Quantifizierung der Resistenz auch in höher-resistenten Bereichen.

C.9.2 Messung von Proteasen aus Patientenmaterial mit niedriger bzw. intermediärer Resistenz

Wie bei der Testentwicklung im Küvettenformat wurde auch in Mikrotiterplatten die Sensitivität der Methode durch Messung von genotypisch als überwiegend niedrig bis intermediär resistent klassifizierten Patienten bestimmt.

	Patient 64 (8 Aminosäureaustausche)				Patient 68 (7 Aminosäureaustausche)			
PI	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}
Amp	$0,34 \pm 0,04$	1,4	1	1	$0,067 \pm 0,02$	0,46	1	1
Ind	$0,36 \pm 0,08$	2,1	1	1	$0,13 \pm 0,08$	0,87	1	1
Nel	$1,2 \pm 0,41$	3,3	3	1	$1,1 \pm 0,20$	3,0	1	1
Rit	$0,35 \pm 0,10$	2,1	1	1	$0,23 \pm 0,02$	1,4	1,75	1
Saq	$0,31 \pm 0,04$	3,6	1	1	$0,11 \pm 0,01$	1,3	1	1
	Patient 71 (9 Aminosäureaustausche)							
PI	K_i^M [nM]	$R_{\text{Fluoreszenz}}$	R_{RPC}	R_{Genotyp}				
Amp	$0,11 \pm 0,075$	0,46	1	1				
Ind	$0,51 \pm 0,29$	3,3	1	1				
Nel	$2,1 \pm 0,57$	5,8	1,75	3				
Rit	$0,66 \pm 0,17$	3,9	3	1				
Saq	$0,56 \pm 0,14$	6,6	1	3				

Tab. C.9. Resistenzdaten von 3 genotypisch vorwiegend als intermediär klassifizierten Patientenproteasen.

Aminosäureaustausche:

Patient 64: E35D, M36I, S37N, I62V, L63P, V77I, V82I, I93L

Patient 68: E35D, M36I, S37N, I62V, L63P, C67E, H69K

Patient 71: E35D, M36I, S37N, I62V, L63P, C67E, H69K, A71T, L90M

In Tab. C.9 stimmen die Resistenzfaktoren aus Fluoreszenzassay und Genotypisierung gut überein. Der enzymatische Test ergibt dabei analog zum Küvettenformat insgesamt höhere Werte als die Vergleichsdaten aus RPC-Auswertung und Genotypisierung. Die Ergebnisse zeigen, dass niedrige Resistenzfaktoren im Mikrotiterplattenformat mit hoher Sensitivität erkannt werden. Abb. C.15 stellt die gute Korrelation von genotypischem Resistenzprofil und funktionellem PR Assay graphisch dar.

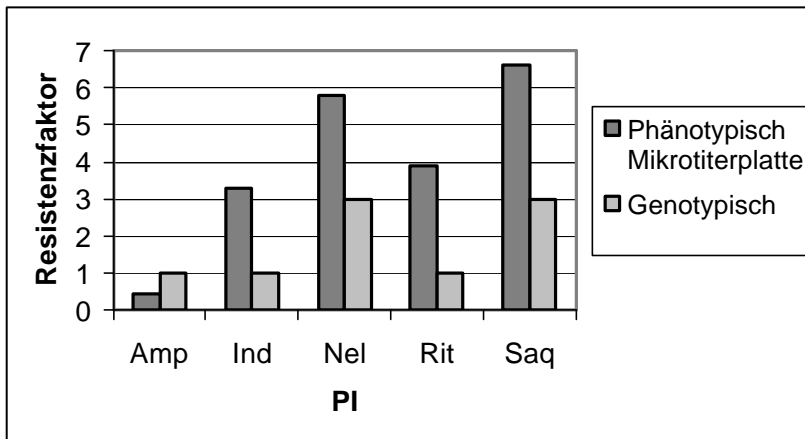


Abb. C.15. Phänotypisch und genotypisch ermittelte Resistenzfaktoren der Patientenprotease 71.

C.9.3 Untersuchung von definierten Mischungen aus hochresistenten Proteasen und Wildtyp

Nach den Ergebnissen von Gehringer (2001) werden im Patientenmaterial vorkommende HIV-Subpopulationen gemäß ihrem Vorkommen im Patientenmaterial gleichmäßig amplifiziert und exprimiert.

Demnach enthält die durch vorliegendes Expressionssystem gewonnene Protease verschiedene Quasispezies im gleichen Verhältnis wie das Patientenmaterial. Die Untersuchung von Proteasen in verschiedenen Mischungsverhältnissen erlaubt deshalb Rückschlüsse auf die Sensitivität des gesamten Assays bezüglich der Detektion von Quasispezies.

In diesem Zusammenhang wurden Gemische zweier hochresistenter PR (202 und 205) mit WT PR gemessen (Tab. C.10).

Mischungsverh.	10% 202	15% 202	5% 205	50% 205
Amp	1,7	2,1	2,4	6,7
Ind	3,1	5,7	2,7	14,7
Nel	1,5	3,8	2,3	16,9
Rit	2,4	6,5	4,8	20,8
Saq	4,8	17,6	7,8	95,2

Tab. C.10. Resistenzfaktoren in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der PR 202 bzw. 205 und WT PR.

Ein Gehalt von 10% Protease 202 bzw. 5% 205 zeigt ein deutlich von reiner WT PR abweichendes Resistenzprofil. Wie erwartet, steigen die Resistenzfaktoren mit zunehmendem Anteil resistenter Protease.

Die Detektionsgrenze ist vom Resistenzgrad der Subpopulation abhängig und kann bei hochresistenten Proteasen wenige Prozente betragen. Genotypische Resistenztests erfassen Quasispezies ab ca. 30% Anteil, der phänotypische Resistenztest mit Fluoreszenzauswertung ist somit diesbezüglich sensitiver.

C.10 Vergleich der Messergebnisse zwischen Küvetten- und Mikrotiterplattenformat

Vor dem Erwerb eines Mikrotiterplattenfluorometers wurden mehrere Geräte getestet, die beiden in die engere Wahl kommenden wurden durch Untersuchung von WT und Patienten PR miteinander verglichen.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Resistenzdaten dreier Patienten PR aus Küvettenformat und den beiden Mikrotiterplattenlesegeräten in folgender Tabelle gemeinsam angegeben.

	Patient 66			Patient 202			Patient 205	
PI	Küvette	Fl 600	F. Asc.	Küvette	Fl 600	F. Asc.	Fl 600	F. Asc.
Amp	3,1	8,9	3,8	6,2	11	14	15,4	18
Ind	14,8	39	32	70,9	39	101	264	283
Nel	36,6	99	94	52,4	40	47	402	390
Rit	47,8	89	56	30,9	45	62	300	244
Saq	57,6	142	57	265,2	175	429	2628	1717

Tab. C.11. Resistenzfaktoren dreier Patienten PR, in Küvettenformat sowie mit den Mikrotiterplattenlesegeräten Fl 600 und Fluoroscant Ascent bestimmt.

Die gute Übereinstimmung der vorliegenden Resistenzdaten spricht für ihre weitgehende Unabhängigkeit vom verwendeten Assayformat und der spezifischen Messtechnik.

Hierbei ist folgender Aspekt wichtig: Wenn veränderte Versuchsbedingungen die Absolutwerte der K_i beeinflussen, so betrifft dies sowohl Wildtyp als auch Patienten PR. Resistenzfaktoren sind miteinander vergleichbar, wenn die K_i der Patienten- und WT PR jeweils unter gleichen Bedingungen gemessen wurden. Im Laufe der Weiterentwicklung des Tests sollten

die K_i der WT Protease bei Veränderungen der Testbedingungen durch genügend Messwerte (ca. 20 pro PI) neu bestimmt werden.

Die Normierung der Resistenzfaktoren erfolgt durch Untersuchung von HIV-Referenzstämmen. Diese enthalten durch Zellkultur-basierte Assays phänotypisch gut charakterisierte Mutationen.

D Diskussion

D.1 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die übergeordnete Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Weiterentwicklung eines enzymatischen HIV Proteaseassays zur schnellen und zuverlässigen Bestimmung von Resistenz gegenüber PI bei HIV-Infizierten.

Stand der Forschung

Resistenzbildung ist ein Hauptproblem in der antiretroviralen Chemotherapie von HIV-Infizierten (Richmann, 2001). Durch die wachsende Verbreitung der Pharmakotherapie von HIV ist ihre Bedeutung stetig gewachsen, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht. Zum einen steigt der prozentuale Anteil von HIV-Infizierten mit resistenten HIV-Populationen. Andererseits steigt die Anzahl der Mutationen pro Patient und damit der Resistenzgrad. Es wurden daher bereits zahlreiche Ansätze zur *in vitro* Messung der HIV-Resistenz entwickelt. Inzwischen wurde der Nutzen solcher Resistenztests sowohl in prospektiven als auch in retrospektiven Studien eindeutig nachgewiesen. (D'Aquila, 1995; Harrigan, 1996; Durant, 1999). Eine durch Resistenzbestimmung gesteuerte Therapie vermeidet daher Nebenwirkungen nicht mehr wirksamer Therapeutika und reduziert unnötige Therapiekosten.

Wie in A.5 beschrieben, lassen sich zwei Testprinzipien unterscheiden. Die genotypische Ermittlung der Resistenz beruht auf der Detektion der Mutationen im jeweiligen Zielenzym. Aus dem Genotyp wird auf die Empfindlichkeit gegenüber den jeweiligen Inhibitoren geschlossen. Bei der phänotypischen Resistenzbestimmung wird die Aktivität der untersuchten Inhibitoren direkt gemessen, eine Kenntnis der die Resistenz verursachenden Mutationen ist dabei nicht notwendig (Garcia-Lerma, Heneine, 2001). Die Vorteile der beiden Testkonzepte liegen in unterschiedlichen Aspekten der Resistenzbestimmung, sie liefern also sich ergänzende Informationen (Vandamme et al., 2001).

Bei allen genotypischen Assays werden zunächst die interessierenden Gene durch PCR amplifiziert. Das Amplifikat wird entweder sequenziert oder durch Hybridisierung auf bekannte Resistenzmutationen hin untersucht. Durch Sequenzierung werden alle Mutationen detektiert, Subpopulationen können in der Regel erst ab einem Anteil von ca. 20 % nachgewiesen werden (Harrigan et al., 2000). Gegenwärtig sind mehrere Kitsysteme zur genotypischen Resis-

tenzbestimmung durch Sequenzierung verfügbar, z. B. TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Kit (Visible Genetics, Toronto, Canada) oder ViroSeq™ HIV Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Interpretation der Sequenzen erfolgt durch systemspezifische Software, die fehlende Vereinheitlichung der Auswertung erschwert jedoch den Vergleich der Ergebnisse.

Auf Hybridisierung basierende genotypische Resistenztests detektieren nur bereits bekannte, ausgewählte Mutationen. (Garcia-Lerma, Heneine, 2001), haben jedoch eine höhere Sensitivität: So können mit INNO-LIPA (Innogenetics, Ghent Belgien) Quasispezies mit einem Anteil unter 10 % an der Gesamtpopulation nachgewiesen werden (Stuyver et al., 1997).

Alle derzeit zur routinemäßigen Untersuchung von Patientenmaterial eingesetzten phänotypischen Resistenztests messen die HIV-Replikation in Zellkultur in Abwesenheit und Gegenwart der therapeutisch angewendeten Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Gene ihrer Zielenzyme werden heute meist mittels PCR amplifiziert und in HIV-Vektoren kloniert, in denen diese Gene deletiert wurden. Die Quantifizierung der Virusreplikation erfolgt meist durch Reportergene. Die beiden kommerziell angebotenen phänotypischen Testsysteme PhenoSense (ViroLogic, San Francisco, CA, USA) und Antivirogram (Virco, Mechelen, Belgien) haben einen Zeitbedarf von 2-3 Wochen und eine untere Detektionsgrenze von 500-1000 Viruskopien/ml (Miller, 2001 a). Die Sensitivität bezüglich Subpopulationen ist mit 10-50% niedriger als bei genotypischen Resistenztests. Bei vergleichender Analyse der beiden kommerziellen Testsysteme haben sich bei PI häufiger unterschiedliche Bewertungen ergeben als bei RTI (Quari et al., 2002).

Der größte Nachteil aller Zellkultur-basierten phänotypischen Resistenztests ist ihr hoher experimenteller Aufwand. Der daraus resultierende hohe Zeitbedarf sowie die hohen Kosten stehen einer weiteren Verbreitung entgegen. Ein diesbezüglicher wesentlicher Fortschritt lässt sich nur durch grundlegend neue Testkonzepte erreichen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Etablierung und Weiterentwicklung eines enzymatischen HIV-1 PR Assays verfolgt. Dabei wurde ein bereits bestehendes Expressionssystem für die Gewinnung enzymatisch aktiver HIV-1 PR verwendet (Gehring et al., 1999; Gehring, 2001).

Die wichtigste Voraussetzung für die Verwendung des Tests als Routineverfahren in der Diagnostik war der Ersatz der RPC-Auswertung der PR-Aktivität durch ein genaueres und an hohen Probendurchsatz adaptierbares Detektionssystem. Verglichen mit kolorimetrischen oder auf Absorption basierenden Tests (Toth et al., 1990), versprach die Fluoreszenzmessung

die höchste Sensitivität. In der Vergangenheit wurden bereits Assays zur enzymatischen Untersuchung der HIV PR mittels Fluoreszenzauswertung entwickelt (Toth et al., 1990; Matayoshi et al., 1990). Diese Assays waren jedoch nicht für die Untersuchung von Patientenmaterial ausgelegt, ausschließlich HIV PR mit definierten Mutationen wurden getestet.

D.2 Konzept und Schlussfolgerungen der bisher durchgeführten Untersuchungen

Der wesentliche neue Aspekt des in dieser Arbeit beschriebenen Testverfahrens ist die enzymkinetische Auswertung von aus Patientenmaterial exprimierter HIV-1 Protease. Damit ist erstmalig die Verwendung eines enzymatischen PR Assays als Resistenztest möglich.

Zunächst wurden die Testbedingungen des Fluoreszenztests so optimiert, dass die PR Aktivität während des Messzeitraums möglichst stabil blieb und ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal erzeugt wurde (C.1.2). Als optimale Exzitationswellenlänge für PIVQ-EDANS erwies sich 360 nm (Abb. C.4). Dieser Wert weicht etwas von dem für reines EDANS in der Literatur angegebenen Wert ab (Kraft, Wang, 1994). Die Gleichheit der Exzitations- und Emissionsspektren von reinem EDANS und Spaltprodukten des Fluoreszenzsubstrates für 360 nm (Exzitation) und 485 nm (Emission) (Abb. C.6) ermöglichte die Eichung der verwendeten Fluorometer mit käuflichem EDANS. Die Bestimmung der Michaeliskonstanten der WT PR (C.2) bestätigte die Voraussetzungen für die Etablierung des enzymatischen Fluoreszenztests und seiner Auswertung mittels der allgemeinen Gleichung für festbindende Inhibitoren (Morrison, 1969). Für WT PR ergab sich eine K_m von ca. 80 μM , Matayoshi et al. erhielten 1990 bei Verwendung eines sehr ähnlichen Substrates 103 μM .

Anschließend wurde geprüft, ob sich die Hemmung der WT PR durch die therapeutisch eingesetzten PI enzymatisch korrekt auswerten lässt (C.5). Die WT K_i wurden dabei mit Literaturwerten aus ähnlichen Fluoreszenzassays verglichen (Klabe et al., 1998). Die Inhibitionskonstanten liegen sehr ähnlich, Nelfinavir weist jeweils den größten Wert auf (Tab. C.4). Die Untersuchung von hochresistenten Patientenproteasen (Tab. C.5) sollte zunächst zeigen, dass sich auch PR mit zahlreichen Resistenzmutationen enzymatisch analog zum WT auswerten lassen. Da der gesamte Assay zur Bestimmung phänotypischer Resistenz bei HIV-Infizierten erstellt wurde, wurden Resistenzdaten der untersuchten Patienten mit Ergebnissen des am Max von Pettenkofer-Institutes etablierten genotypischen Resistenztests verglichen. Die Messung von niedrig resistenten Patienten ergab eine ausreichende Sensitivität des Tests

(Tab. C.6). Unabhängig vom Resistenzgrad korrelieren die phänotypischen Resistenzfaktoren gut mit den genotypischen, liegen aber insgesamt deutlich höher (D. 4.2). So hat Patient 202 in Tab. C.5 geno- und phänotypisch die höchsten Resistenzfaktoren. Die Resistenz gegenüber Amprenavir ist insgesamt am geringsten, die gegen Saquinavir und Nelfinavir am höchsten. Gegenüber Auswertung mittels RPC ergibt der Fluoreszenztest eine bessere Differenzierung der Resistenzfaktoren. In Tabelle C.6. zeigt Patient 4 jeweils die ausgeprägteste Resistenz. Ob niedrige phänotypische Resistenzfaktoren wie bei den genotypisch sensitiven Patientenproben 6, 7, und 8 eine signifikante Resistenz anzeigen, lässt sich nur durch Untersuchung größerer Patientenzahlen beantworten.

Nachdem die prinzipielle Funktionsfähigkeit des gesamten Tests gezeigt wurde, erfolgte der Transfer in Mikrotiterplattenformat als Voraussetzung für seinen Einsatz in der Routinediagnostik (C.7, C.8). Die Inhibitionskonstanten der WT PR liegen in beiden Formaten sehr ähnlich (Tab. C.7), Saquinavir hat jeweils den niedrigsten, Nelfinavir den höchsten Wert. Die K_i von 4 genotypisch überwiegend hochresistenten Patienten konnten verlässlich bestimmt werden, wie die geringen Standardabweichungen in Tab. C.8 zeigen. Die Messung von 3 sensitiven bzw. niedrig resistenten PR ergab eine gute Korrelation zum Genotyp mit ebenfalls höheren Resistenzfaktoren (Tab. C.9).

Während der Entwicklung und Validierung erwiesen sich folgende Aspekte als kritisch und erforderten eine intensive Bearbeitung:

- Die Registrierung der PR-Aktivität musste möglichst sensitiv sein, da bei Expression aus Patientenmaterial die Ausbeute enzymatisch aktiver Protease teilweise sehr niedrig war. Mögliche Ursachen dafür sind die Toxizität der HIV PR für *E. coli* oder Präzipitation des Enzyms. Zusätzlich können niedrige Viruslast oder Mutationen innerhalb des PR-Gens die Expression erschweren.
- Die Löslichkeit des recht hydrophoben Fluoreszenzsubstrates in wässrigen Lösungen ist relativ gering und von Testbedingungen (z. B. DMSO-Gehalt, Temperatur) abhängig.

Da das Neuartige des vorliegenden enzymatischen Assays die Resistenzbestimmung aus Patientenmaterial ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich Wildtyp- und Patienten PR untersucht. Anhand dieser Messungen wurde der gesamte Resistenztest, insbesondere der Fluoreszenzassay optimiert.

D.3 Zusammenfassende Bewertung des gesamten Resistenztests zum aktuellen Stand

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war ein bestehendes Expressionssystem für HIV-1 Protease aus Patientenmaterial in *E. coli* (Gehring, 2001). Durch die Etablierung des Fluoreszenzmessverfahrens konnte erstmalig ein enzymatischer HIV-1 PR Resistenztest entwickelt werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen:

- Die Aktivität der rekombinant in *E. coli* exprimierten HIV PR wird durch die therapeutisch eingesetzten PI effizient gehemmt. Diese wirken sowohl bei WT- als auch bei aus Patientenmaterial exprimierten Proteasen als kompetitive festbindende Inhibitoren. Ihre Inhibitionskonstanten lassen sich unter den Testbedingungen reproduzierbar bestimmen.
- Durch das derzeit eingesetzte, verbesserte Expressionssystem unter Verwendung einer „nested-PCR“ kann bei Verwendung von Patientenmaterial als Ausgangsmaterial ausreichend HIV PR für die Erstellung eines kompletten Resistenzprofils erhalten werden. Die untere Amplifikations- und damit auch Expressionsgrenze liegt mit dem jetzigen Protokoll bei ca. 1000-2000 Geq/ml.
- Die Inhibitionskonstanten der PI sind vom Format des Fluoreszenztests unabhängig. Der im Küvettenformat etablierte PR Assay wurde deshalb zum Durchsatz einer hohen Probenzahl auf ein 96-Well Mikrotiterplattenformat übertragen.
- Sowohl Sensitivität als auch Spezifität sind hoch. So konnten 5% einer hochresistenten PR neben WT im Überschuss nachgewiesen werden, es wurde keine unspezifische Spaltung des Substrates z. B. durch *E. coli* Proteine beobachtet. Die Ergebnisse zeigen bei niedrig und bei hochresistenten Patienten eine gute Korrelation zu genotypischen Resistenzdaten.
- Der Zeitbedarf für die Durchführung des gesamten Tests liegt bei 7-8 Arbeitstagen und damit deutlich unter dem derzeit eingesetzter Resistenztests in Zellkultur.

Bei den bisher untersuchten Patienten wurden die Ergebnisse des PR-Resistenztests mit genotypischen Resistenzdaten verglichen. Die enzymatische Resistenzbestimmung lieferte dabei hauptsächlich in folgenden Fällen wichtige zusätzliche bzw. von genotypischen Daten abweichende Informationen:

- wenige Mutationen im PR-Gen mit sensitiver bis intermediärer genotypischer Einstufung. Der Fluoreszenztest kann durch die insgesamt höheren Resistenzfaktoren diese

auch besser differenzieren und quantifizieren Probe 7 und 8 (Tab. C.6) sowie Probe 71 (Tab. C.9).

- unklare/fragliche Resistenz gegen neu entwickelte PI (Atazanavir, Lopinavir), für die bisher nur wenige Resistenzmutationen beschrieben wurden.
- zahlreiche Sekundärmutationen, deren Interaktionen schwer vorhergesagt werden können. So zeigt Patientenprobe 205 gegenüber 202 (Tab. C.8) bei vergleichbarer genotypischer Einstufung höhere phänotypische Resistenzfaktoren.

Die Plausibilität und biologische Wertigkeit der Ergebnisse wurde durch Vergleich der im enzymatischen Assay eingesetzten PI Konzentrationen mit Angaben zu ihrer minimalen Plasmakonzentration *in vivo* geprüft. Diese muss dabei durch einen Korrekturfaktor dividiert werden, der die Bindung der PI an Plasma-Proteine berücksichtigt. Auf diese Weise erhielten Montaner et al. (2001) für die klinisch eingesetzten PI in üblicher Dosierung Werte von 4-105 nM. Sie liegen um das 50-1250 fache höher als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit enzymatisch gemessenen K_i für WT Protease (Tab. C.7). Dies ist plausibel, da *in vivo* die HIV PR nicht als freies Enzym vorliegt, sondern an zelluläre und virale Strukturen gebunden ist.

Mit dem vorliegenden Assay kann aus Patientenmaterial exprimierte HIV PR auch über die Bestimmung der K_i hinaus enzymatisch untersucht werden. Die Ermittlung der Michaeliskonstante gibt Aufschluss über die Auswirkung von Mutationen auf die Affinität der HIV Protease zum Fluoreszenzsubstrat. Durch Gl. B.6 kann die katalytische Konstante k_{cat} berechnet werden.

Der Quotient k_{cat}/K_m ist ein Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms (Wilson et al., 1997). Durch Kenntnis der katalytischen Effizienz der HIV PR sind Rückschlüsse auf die Replikationsfähigkeit der jeweiligen Mutante möglich. Von der Ermittlung der „Fitness“ der Viruspopulation eines Patienten erhofft man sich in Zukunft ähnlich wie von *in vitro* Resistenzbestimmungen Informationen zur Steuerung der antiretroviralen Therapie (Mammano, 2000; Larder, 2001; Miller, 2001 a).

D.4 Vergleich des vorliegenden Assays mit Zellkultur-basierter Resistenzbestimmung

Alle derzeit in der Routinediagnostik verwendeten Assays zur phänotypischen Resistenzmessung der HIV Protease basieren auf der Messung des Wachstumsverhaltens von rekombinantem HIV in Zellkultur (A.5.2.1).

In Tabelle D.1 ist der in dieser Arbeit weiterentwickelte Resistenztest mit diesen Verfahren verglichen.

	Enzymatischer HIV PR Resistenztest	Bestimmung der HIV PR Resistenz in Zellkultur
Mindestdauer	5d + 3 h/ Patient	2-3 w
Kosten	Relativ niedrig (ca. 250-375 €)	Hoch (ca. 750-1000 €)
Sensitivität	Hoch < 10%	10-40% (der Gesamt-population)
Messbereich	Groß	kleiner
Standardisierbarkeit	Standardisierung durch Mitmessen der WT- Protease auf jeder Platte vergleichsweise gut möglich	Zellkultur schwierig zu standardisieren
Anwendungsbreite	Nur PR	PR, RT, auf weitere Enzyme erweiterbar

Tab. D.1. Vergleich zwischen enzymatischem HIV PR-Resistenzassay und Zellkultur-basierten Verfahren der HIV Resistenzbestimmung.

D.4.1 Zeitbedarf für gesamten Resistenztest bei Auswertung im Mikrotiterplattenformat

Phänotypische Tests in Zellkultur benötigen in der Regel 2-4 Wochen, was im klinischen Alltag häufig zu lang ist (Flexner, 2000).

Der wichtigste Vorteil des hier beschriebenen Assays ist deshalb sein vergleichsweise geringer Zeitbedarf:

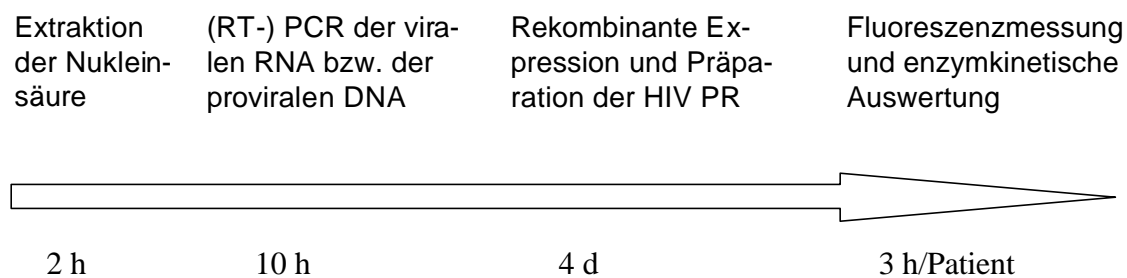


Abb. D.1. Schema des zeitlichen Ablaufs des gesamten Resistenztests.

Diese Zeitangaben gelten bei Verwendung vorpipettierter Mikrotiterplatten, die bei -20°C mehrere Wochen haltbar sind. Dabei werden die in großen Ansätzen hergestellten Reaktionslösungen für den Fluoreszenztest in die Mikrotiterplatten vorpipettiert und diese eingefroren. So wird einerseits der Arbeitsaufwand verringert und andererseits eine größere Konstanz zwischen den einzelnen Messungen erreicht. Der Zeitbedarf des gesamten Resistenztests beträgt unter diesen Bedingungen für 4 Patienten 6 Arbeitstage. Insgesamt erstreckt sich der Ablauf des Assays dabei auf knapp 40 h, davon sind 16 bis 18 h effektive Arbeitszeit.

Die Lagerungsfähigkeit vorpipettierter Platten bei ca. -20°C erlaubt eine flexible zeitliche Gestaltung der Fluoreszenzmessung.

D.4.2 Sensitivität

Die Sensitivität des Assays wurde sowohl durch Messung niedrig resistenter HIV PR als auch durch Messung von definierten Mischungen aus hochresistenten und WT PR untersucht. Genotypisch als sensitiv bzw. niedrig resistent eingestufte Proteasen ergaben im enzymatischen Assay höhere Resistenzfaktoren. Dies bestätigt sich in der Literatur: Maschera et al. (1995) beobachteten bei der Untersuchung von HIV PR mit definierten Mutationen der enzymatischen Untersuchung 10- bis 79-fach höhere Resistenzfaktoren gegenüber phänotypischen Er-

gebnissen aus Zellkultur. Ähnliches wurde von Klabe et al. 1998 berichtet. Eine mögliche Ursache dafür ist der direkte Kontakt zwischen Inhibitor und Protease, sowie das Fehlen Zellkultur-spezifischer Faktoren (z. B. Zelltyp, Wachstumsgeschwindigkeit) im enzymatischen Assay. Die Tatsache, dass im Fluoreszenztest auch bei genotypisch als niedrig resistent bis sensitiv eingestuften Proteasen höhere Resistenzfaktoren gemessen wurden, ist aus folgendem Grund bedeutsam: Nach Angaben in der Literatur ergeben HIV PR mit wenigen Mutationen bei phänotypischer Untersuchung in Zellkultur häufig keine messbare Resistenz (Hertogs et al., 1998; Petropoulos et al., 2000). Unabhängig von der noch zu untersuchenden klinischen Relevanz solcher niedriggradiger Resistenz hat der enzymatische Fluoreszenztest hier eine höhere Sensitivität. Er erlaubt eine genauere Differenzierung und Quantifizierung niedriggradiger Resistenzen. Die hohe Sensitivität bestätigte sich auch bei der Messung von Mischungen aus hochresistenten und WT Proteasen: Die Zugabe von 5% einer hochresistenten PR zu WT PR konnte noch reproduzierbar nachgewiesen werden (C.9). Der große Messbereich des enzymatischen Assays stellt somit eine hohe Sensitivität sowohl bei der Detektion niedrig resistenter Proteasen als auch bezüglich eventuell vorhandener Quasispezies sicher. Dieser Sensitivitätsgewinn ist vor allem bei parallel vorliegenden Quasispezies mit unterschiedlichem Resistenzprofil bedeutsam, da phänotypische Resistenzbestimmung hier verlässliche und wesentlich einfacher zu interpretierende Ergebnisse liefert. Literaturangaben zufolge werden die bisher verfügbaren phänotypischen Resistenztests in Zellkultur jedoch gegenüber genotypischen Assays als weniger sensitiv bezüglich der Detektion von Subpopulationen mit kleinem prozentuellen Anteil angesehen (Rodriguez-Rosado et al., 1999). Diese werden in der Regel erst ab einem Anteil von 10-40% an der Gesamtpopulation detektiert (Petropoulos et al., 2000; Hanna, D'Aquila, 2001).

Die untere Amplifikationsgrenze der „nested PCR“ und damit die Detektionsgrenze des gesamten Resistenztests liegt nach bisherigen Erfahrungen bei 1000-2000 Geq/ml (Strommer, persönliche Mitteilung). Für phänotypische Resistenztests in Zellkultur werden in der Literatur ähnliche Werte angegeben (Flexner, 2000; Hanna, D'Aquila, 2001).

D.4.3 Kosten für gesamten Resistenztest

Die Kosten für den Assay setzen sich pro Patient aus ca. 100 € Materialkosten, sowie ca. 125 € für die Arbeitszeit des Laborpersonals zusammen. Diese Summen gelten bei gemeinsamer Expression von 4 HIV Proteasen aus Patientenmaterial und Verwendung vorpipettier-

ter, bei -20°C gelagerter Platten. Das Fluoreszenzsubstrat verursacht dabei mit ca. 50 €/Platte den Hauptanteil der Materialkosten.

Phänotypische Assays in Zellkultur sind mit 700-1000 \$ deutlich kostspieliger (Flexner, 2000).

Durch diesen deutlichen Preisvorteil des enzymatischen Assays könnte die phänotypische Resistenzbestimmung für wesentlich mehr Patienten verfügbar gemacht werden. Durch die vergleichsweise schnelle Verfügbarkeit des Ergebnisses ist es auch sinnvoll, den Test in kürzeren Abständen durchzuführen, wenn das Auftreten von Resistenzen vermutet wird.

D.5 Vorteile und Nachteile des enzymatischen Resistenztests

Aus den bisherigen Ergebnissen des enzymatischen PR-Resistenztests in seiner derzeitigen Form ergeben sich gegenüber den bisher verwendeten phänotypischen Assays folgende wichtige Vor- und Nachteile:

Niedriger Zeit- und Kostenaufwand

Die Entwicklung eines schnellen, zuverlässigen Testprotokolls ohne die Anwendung von HIV-infizierter Zellkultur war das wichtigste Ziel der vorliegenden Arbeit. Abbildung D.1 verdeutlicht, dass ein vollständiges Resistenzprofil gegen die derzeit verwendeten PI innerhalb einer Woche erstellt werden kann.

Hohe Sensitivität

Die Resistenzfaktoren des Fluoreszenztests sind höher als genotypische oder phänotypische Zellkultur-basierte Resistenzdaten (D.4.2). Dies gilt sowohl für hoch- als auch für niedrig resistente Patienten.

Der größte Nachteil des bestehenden Verfahrens ist seine Beschränkung der Resistenzmessung auf die HIV PR, die RT kann mit dem Fluoreszenzassay nicht untersucht werden. Die *in vitro* Messung der RT-Aktivität erfordert grundlegend andere Testkonzepte, wie z. B. Amp-RT Assay (Garcia-Lerma et al., 1999; Vasquez-Rosales et al., 1999).

D.6 Ausblick, zukünftige Experimente

D.6.1 Validierung des gesamten Resistenztests

D.6.1.1 Untersuchung von HIV-Referenzstämmen

Die Resistenzbestimmung von HIV-Isolaten mit bekannten, gut charakterisierten Mutationen ermöglicht die Korrelation der durch den eigenen Test ermittelten Resistenzfaktoren mit Zellkultur-basierten phänotypischen Testergebnissen und genotypischen Resistenzdaten.

Zur Zeit werden Messungen von HIV-Isolaten aus Zellkultur durchgeführt. Anders als Patientenmaterial enthalten diese Isolate ausschließlich bereits charakterisierte Mutationen und keine Quasispezies. Dies ermöglicht einen direkten und validen Vergleich mit Ergebnissen aus unterschiedlichen phänotypischen Tests. Auch die Korrelation zu genotypischen Resistenzdaten ist wegen des Fehlens von Quasispezies aussagekräftiger. Um die gleichen Testbedingungen wie bei der Untersuchung von Patientenmaterial zu gewährleisten, wird als Ausgangsmaterial RNA verwendet, die aus Zellkulturüberstand extrahiert wurde.

D.6.1.2 Ermittlung analytischer (technischer) Grenzwerte

Im Zuge der Einführung des Resistenztests in die Routinediagnostik ist die Bestimmung des analytischen „Cut-off“-Wertes für jeden PI geplant (A.5.2.3). Dies erfolgt durch Untersuchung des HIV WT in voneinander unabhängigen Testdurchgängen.

D.6.1.3 Korrelation der Resistenzdaten mit dem klinischen Verlauf

Die Korrelation der Testergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten (A.5.4) liefert wichtige Informationen zur Bewertung der Resistenzfaktoren im Hinblick auf die *in vivo* Wirksamkeit der PI, wenn auch die genaue Festlegung der „clinical cut-offs“ bei phänotypischen Resistenztests schwierig ist (A.5.3). In mehreren Studien wurde bei Patienten nach Therapieversagen der Nutzen von Resistenzbestimmungen geprüft. In der VIRADAPT-Studie wurde die Therapieumstellung in einem Studienarm nach Ergebnissen der genotypischen Resistenzbestimmung und in der Kontrollgruppe nach klinischer Erfahrung („standard of care“) vorgenommen. Die Patientengruppe mit Resistenztest zeigte einen signifikant stärkeren Abfall der HIV-RNA (Durant et al., 1999). Analoge Resultate für den phänotypischen Antivirogramm Assay (Virco) wurden von Cohen et al. (2000) berichtet. Mit den derzeit verfügbaren Resistenztests kann nach Rusconi et al. (2000) eher bei Resistenz als bei Sensitivität von *in vitro* auf die *in vivo* Situation geschlossen werden.

Ein ähnlicher Vergleich des eigenen Resistenztests mit „standard of care“ nach Therapieversagen ist in Kooperation mit der Infektionsambulanz der Medizinischen Poliklinik als prospektive Studie geplant. Die Wirksamkeit der neu eingestellten antiretroviralen Therapie wird durch klinische Verlaufparameter, z. B. Viruslast und CD4-Zahl in einem festgelegten Beobachtungszeitraum (ca. 1 Jahr), überprüft.

D.6.2 Expression der HIV Protease mittels gekoppelter *in vitro* Transkription/Translation

Da der Fluoreszenztest im 96-Well Format für hohen Probendurchsatz etabliert werden konnte, nimmt die rekombinante Expression der HIV Protease in *E. coli* den weitaus größten Teil der für den gesamten Resistenztests benötigten Zeit in Anspruch.

Die Vereinfachung dieses Schrittes im Testablauf verspricht daher den größten Zeitgewinn.

Hier ist die *in vitro* Transkription/Translation ein erfolgversprechendes Verfahren.

Dabei finden Transkription und Translation des jeweiligen Proteins nicht in Kompartimenten lebender Zellen statt, sondern *in vitro* in einem nicht kompartimentierten Reaktionsmedium.

Dieses besteht hauptsächlich aus Zellysat, das die notwendigen Komponenten, wie Polymerasen und Ribosomen enthält. Als Edukte der Transkriptions- und Translationsreaktion dienen Nukleotide und Aminosäuren. Grundsätzlich können Lysate aus unterschiedlichen Zellen wie z.B. *E. coli* oder Kaninchenerythrozyten eingesetzt werden.

Im vorliegenden Resistenztest gewährleistet die Verwendung eines *E. coli* Lysates die beste Vergleichbarkeit mit dem bisher verwendeten Expressionssystem.

Derzeit werden mehrere Kitsysteme kommerziell angeboten, die solche Lysate verwenden.

Mit RTS 500 (Roche, Penzberg) wurde in eigenen Vorexperimenten enzymatisch aktive HIV PR exprimiert. Dabei wurde das amplifizierte PR-Gen mit einem zu diesem Zweck mitgelieferten Vektor ligiert, das entstehende zirkuläre Plasmid diente als „Template“ für die kombinierte Transkription/Translation.

Am zeitsparendsten wäre die Verwendung des PR-Amplifikates als Template. Der gesamte Resistenztest könnte so in 4 Tagen durchgeführt werden.

Die Expression der HIV PR *in vitro* ist außerdem weniger Störgrößen ausgesetzt als die Expression in *E. coli*, eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist deshalb zu erwarten.

D.7 Nutzen des Assays in der Patientenbetreuung, mögliche Einsatzfelder

Der Nutzen der Resistenzbestimmung in der HIV-Therapie wird heute allgemein anerkannt. Resistenz gegen antiretrovirale Pharmakotherapie äußert sich in der Regel in einer Zunahme der Viruslast. Da die Höhe der Viruslast deutlich mit der teilweise irreversiblen Krankheitsprogression korreliert (Mellors et al., 1996), wird gerade bei der HIV Infektion eine möglichst vollständige Hemmung der Virusreplikation angestrebt. Resistenzbestimmung kann je nach klinischer Situation helfen, die Viruslast nach Therapieversagen rasch und effizient zu senken oder bereits ein Ansteigen zu verhindern. Dies dient zur Prävention schwerer HIV-assoziiertes Neoplasien und opportunistischer Infektionen.

Der vorliegende Resistenztest erlaubt erstmalig die enzymatische Bestimmung phänotypischer HIV-1 Proteaseresistenz. Dies bringt gegenüber Assays in Zellkultur eine wesentliche Reduktion des Zeit- und Kostenaufwandes mit sich. Darüber hinaus sind die apparativen Anforderungen deutlich geringer. Sofern die Voraussetzungen zur bakteriellen Expression und enzymatische Untersuchung der Protease vorliegen, kann der Assay in den Routinebereich eines virologischen Institutes eingegliedert werden.

Phänotypische Resistenzmessung kann deshalb durch den vorliegenden Test einem größeren Patientenkollektiv verfügbar gemacht werden.

Der Hauptvorteil des vorliegenden Assays gegenüber den bisher angewendeten phänotypischen Resistenztests ist die Verfügbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Woche sowie die hohe Sensitivität (D.4.1 und D.4.2). Dies ist in allen klinischen Situationen bedeutsam, da eine hohe Viruslast bei insuffizienter Therapie zeitabhängig zu einer irreversiblen Schädigung des Immunsystems führen kann. Zudem fördert suboptimale Therapie in resistenten HIV Proteasen das Auftreten von kompensatorischen Mutationen, die die „Fitness“ der mutierten Quasispezies erheblich verbessern können (Nijhuis et al., 1999).

Der Zeitfaktor spielt eine besondere Rolle in nachfolgend angeführten klinischen Situationen, für die Resistenzbestimmung von der „EuroGuidelines Group for HIV Resistance“ 2001 ausdrücklich empfohlen wird (A.5.4).

Akute HIV-Infektion

Der vorliegende Assay ermöglicht eine rasche, auch Quasispezies berücksichtigende Anpassung der Pharmakotherapie an das individuelle Resistenzprofil des Patienten. Die Viruslast

des Patienten kann so rasch und effizient gesenkt werden, was für den weiteren Verlauf der HIV-Infektion wichtig ist (Correy et al., 2001; van Rossum et al., 2002). Resistenzbestimmung hat für diese neue Therapieindikation wahrscheinlich eine größere Bedeutung als bei chronischer HIV-Infektion und Therapieversagen (Flexner, 2000).

HIV-Infektion in der Schwangerschaft

Um das Risiko einer vertikalen Übertragung möglichst stark zu verringern, ist eine rasche Identifikation und Verabfolgung voll wirksamer, nicht resistenzassoziierter Pharmaka wichtig (Hirsch et al., 2000). Außerdem muss jede Pharmakotherapie in der Schwangerschaft besonders genau abgewogen werden.

Postexpositionsprophylaxe (PEP) nach HIV-Exposition

Die Entscheidung über eine PEP mit antiretroviralen Medikamenten hängt hauptsächlich vom Infektionsrisiko ab und muss rasch getroffen werden, da ihre Wirksamkeit im hohen Maß vom Zeitpunkt ihres Beginns abhängt (CDC, 1998). Da die PEP in der Regel über 2 Wochen durchgeführt wird, kann sie nur bei sehr schneller Verfügbarkeit der Resistenzergebnisse (möglichst unter einer Woche) an diese angepasst werden.

Untersuchung der Aktivität neuer PI

Zur Anwendung phänotypischer Resistenztests in präklinischen Studien neuer PI können klare Empfehlungen gegeben werden (Richman, 2000): Zunächst wird die Aktivität des neuen Wirkstoffes gegenüber verschiedenen WT-Isolaten sowie gut charakterisierten resistenten HIV-Stämmen gemessen. Anschließend erfolgt die Untersuchung klinischer Isolate mit unterschiedlichem Resistenzprofil gegenüber bereits zugelassenen PI.

Mehrfach vorbehandelte Patienten mit komplexen Mutationsmustern weisen häufig Resistenzen gegen neue, noch nicht zugelassene Inhibitoren auf. (Harrigan, Cote, 2000). Viele Autoren fordern daher eine umfangreiche Untersuchung der Aktivität neuer Inhibitoren gegen hochresistente HIV-Isolate bereits während ihrer Entwicklungsphase (Palmer et al., 1999; Harrigan, Cote, 2000;). Dies ist gerade für PI wegen der Häufigkeit von Kreuzresistenzen wichtig. Außerdem werden alle für die genotypische Resistenzbestimmung notwendige Informationen zur Bewertung von Aminosäureaustauschen zunächst durch phänotypische Tests und epidemiologische Daten gewonnen.

Die Testdurchführung prädestiniert den vorliegenden Assay für dieses Einsatzgebiet, da mit vergleichsweise geringem Aufwand einerseits definierte Mutationen und andererseits Patientenmaterial nach Verabfolgung neuer PI in klinischen Studien untersucht werden können.

Außerdem wird im Unterschied zu den gebräuchlichen phänotypischen Verfahren die HIV-1 PR völlig unabhängig von der RT exprimiert und ihre Resistenz bestimmt.

Der Bedarf an Methoden zur *in vitro* Resistenzbestimmung von HIV wird aus verschiedenen Gründen in Zukunft steigen:

- Resistenzen werden durch die zunehmende Zahl der antiretroviral therapierten Patienten an Bedeutung gewinnen.
- Durch die Entwicklung neuer Präparate mit teilweise völlig anderen Wirkmechanismen stehen im Falle von Resistenzen zunehmend alternative Therapieoptionen zur Verfügung, deren Einsatz rational zu prüfen ist.

Der vorliegende Test ist wegen des niedrigen Zeit- und Kostenaufwands sowie der hohen Sensitivität ein vielversprechendes Verfahren zur phänotypischen HIV Resistenzbestimmung. Die größten Vorteile bietet er in Konstellationen, in denen diese Eigenschaften besonders wichtig sind.

Epidemiologische Untersuchungen zur Übertragung resistenter HIV Stämme und Resistenzmessungen von in Entwicklung befindlichen PI sind weitere sehr geeignete Anwendungen des enzymatischen Proteaseassays.,

Seine Weiterentwicklung und klinische Validierung lohnt sich deshalb sowohl aus rein wissenschaftlicher als auch aus diagnostisch-klinischer Sicht.

LITERATURVERZEICHNIS

- Acosta E. P., T. Kakuda, R. Brundlage, P. Anderson, and C. Fletcher (2000). Pharmacodynamics of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* **30**, Suppl. 2: 151-159.
- Barre-Sinoussi F., L. Montagnier et al. (1984). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient with risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
- Baum E., G. Beberitz, and Y. Gluzman (1990). Isolation of mutants of human immunodeficiency virus protease based on the toxicity of the enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**(14): 5573-5577.
- Berrey M. M., L. Corey et al. (2001). Treatment of primary human immunodeficiency virus type 1 infection with potent antiretroviral therapy reduces frequency of rapid progression to AIDS. *J. Infect. Dis.* **183**(10):1466-75.
- Billich S. et al. (1988). Synthetic peptides as substrates and inhibitors of human immune deficiency virus-1 protease. *J. Biol. Chem.* **88**: 17905-17908.
- Bieth J. G. (1995). Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods in Enzymology* **248**: 59-84.
- Bilello J. A., B. Bilello, K. Stellrecht, J. Leonard, D. Norbeck, D. Kempff, T. Robinss, and G. Drusano (1996). Human serum alpha 1 acid glycoprotein reduces uptake, intracellular concentration and antiviral activity of A-80987, an inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1491-1497.
- Birnboim H. C. and J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523.
- Bröker, M. (1986). Vectors for regulated high-level expression of proteins fused to truncated forms of *Escherichia coli* β -Galactosidase. *Gene Anal. Techn.* **3**: 53-57.
- Call S. A., M. Saag, A. Westfall, J. Raper, S. Pham, J. Tolson, N. Hellmann, G. Cloud, and V. Johnson (2001). Phenotypic drug susceptibility testing predicts long-term virologic suppression better than treatment history in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **183**: 401-408.
- Centers for Disease Control (1998). CDC public health service guidelines for the management of healthcare worker exposures to HIV and recommendations for post exposure prophylaxis. *MMWR No RR-7*, **47**:1-33.

Christopher U., and U. Hellen (1994). Assay methods for retroviral proteases. *Methods in Enzymology* **241**: 46-58.

Cohen C., S. Hunt, M. Sension et al. (2000). Phenotypic resistance testing significantly improves response to therapy: a randomised trial [abstract 237]. In: Program and abstracts of the 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, 30 January 2 February 2000. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health.

Colicelli J., S. Goff (1985). Mutants and pseudorevertants of Moloney murine leukemia virus with alterations at the integration site. *Cell* **42**: 573-580.

Cozzi Lepri A., C. Sabin, S. Staszewski, K. Hertogs A. Müller, H. Rabenau, A. Phillips, and V. Miller (2000). Resistance profiles in patients with viral rebound on potent antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **181**: 1143-1147.

Cooper M., A. Lawton (1998). Primary immune deficiency diseases. In Harrison's principles of internal medicine, 14th edition, 1783-1790. McGraw-Hill, New York.

Department of Health and Human Services (1998). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. *Ann. Intern. Med.* **128**: 1079-1100.

Domingo E., J. Holland, C. Bierbricher and M. Eigen. Quasispecies: The concept and the word (1995). In Gibbs A., C. Calisher, F. Garcia-Arenal, editors. *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge University Press **171**.

Dower W. J., J. Miller, and C. Ragsdale (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16** (13): 6127-6145.

Durant J., P. Clevenbergh, P. Halfon et al. (1999). Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: The VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* **353**: 2195-9.

The EuroGuidelines Group for HIV Resistance (2001). Clinical and laboratory guidelines for the use for HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. *AIDS* **15**: 309-320.

Eberle J., B. Bechowsky, D. Rose, U. Hauser, K. von der Helm, L. Gürtler, and H. Nitschko (1995). Resistance of HIV type 1 to proteinase inhibitor Ro 31-8959. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **11**, No 6: 671-676.

Erickson J. W., S. Gulnik, and M. Markowitz (1999). Protease inhibitors: Resistance, cross-resistance, fitness and the choice of initial and salvage therapies. *AIDS* **13**: 189-204.

Ermolieff J., X. Lin and j. Tang (1997). Kinetic properties of saquinavir-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 protease and their implications in drug resistance in vivo. *Biochemistry* **36** (40): 12364-12370.

Flexner C. F. (1998). HIV Protease inhibitors. *New Engl. J. Med.* **338** (18): 1281-1291.

Flexner C. F. (2000). HIV Genotype and phenotype-arresting resistance? *JAMA* **283**, No 18: 2442-2445.

Freed E. O. and M. Martin (2001). HIVs and their replication. In: *Fields virology*, Vol. II, D. M. Knipe and P. Howley, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: pp 1971-2041.

Gallo R. C., S. Salahuddin, et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503

Garcia-Lerma H., R. Schinazi, A. Juodawlkis, V. Soriano, Y. Lin, K. Tatti, D. Rimland, T. Folks and W. Heneine (1999). A rapid non-culture-based assay for clinical monitoring of phenotypic resistance of human immunodeficiency virus type 1 to lamivudine (3 TC). *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 264-270.

Garcia-Lerma G. and W. Heneine (2001). Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing. *J. Clin. Virol.* **21**: 197-202.

Gehring H., B. Weissbrich, C. Jassoy, H. Klinker, P. Langmann, H. Nitschko and K. von der Helm (1999), *European J. of Med. Res.* **4**, Suppl. 1: 60-61.

Gehring H. (2001). Etablierung und Evaluierung eines neuartigen phänotypischen Testsystems zur Bestimmung der Resistenz gegen HIV-1-Protease-Inhibitoren. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Geoghegan K. F., R. Spencer, D. Danley, L. Contillo, J. and G. Andrews (1990). Fluorescence-based continuous assay for the aspartyl protease of human immunodeficiency virus-1. *FEBS* **262**, No 1: 119-122.

Gulick R. M., J. Mellors, D. Havlir, J. Eron, C. Gonzales, D. McMahon, D. Richman, F. Valente, L. Jonas, A. Meibom, E. Emini and J. Chodakewitz (1997). Treatment with indinavir, zidovudine and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New Engl. J. Med.* **337**: 734-7399.

Gulick R. M., et al. (2000). 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine and lamivudine. *Ann. Intern. Med.* **133**(1): 35-39.

Hanna G. J., R. D'Aquila (2001). Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 774-782.

Hanna G. W., A. Caliendo (2000). Testing for HIV-1 drug resistance. *Mol. Diag.* **6**: 253-263.

Harrigan P. R. and H. Cote (2000). Clinical utility of testing human immunodeficiency virus for drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* **30**, Suppl. 2: 117-122.

Haubrich R. and L. Demeter. International perspectives on antiretroviral resistance. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations (2001). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **26**, Suppl. 1: 51-59.

Hellen C. U. T. (1994). Assay methods for retroviral proteases. *Methods in Enzymology* **241**: 46-58.

von der Helm K. (1977). Cleavage of Rous sarcoma virus polypeptide precursor into internal structural proteins in vitro involves viral protein p15. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 911-915.

von der Helm K., S. Seelmeier, A. Kisselev and H. Nitschko (1994). Identification, Purification and Cell Culture Assays of Retroviral Proteases. *Methods Enzymol.* **241**: 89-104.

von der Helm, K. (1996). Retroviral proteases: Structure, Function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV Therapy. *Biol. Chem.* **377**: 765-774.

Heneine W., S. Yamamoto, W. Switzer, T. Spira and T. Folks (1995). Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* **171**: 1210-1216.

Hertogs K., M-P. de Bethune, V. Miller, T. Ivens, P. Schel, A. van Chauvenberge, C. van den Eynde, V. van Geren, H. Azijn, M. van Houtte, F. Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp, B. Larder, and R. Pauwels (1998). A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 269-276.

Hirsch M. S., B. Conway, R. D'Aquila (1998). Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. *JAMA* **279**: 1984-1991.

Hirsch M. S., D. D. Richmann et al. (2000). Antiretroviral resistance testing in adult HIV-1 infection. Recommendations of an international AIDS Society-USA panel. *JAMA* **283**: 2417-2426.

- Jarmy G., M. Heinkelein, B. Weissbrich, C. Jassoy and A. Rethwilm (2001). Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J. Med. Virol.* **64**: 223-231.
- Japour A. J., D. Mayers and V. Johnson et al. (1993). Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human deficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (5): 1095-1101.
- Johanson J. et al. (2001). A new ultrasensitive assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma. *J. Virol. Methods*, **95**: 81-92.
- Katz R., A. Skalka (1994). The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 133-173.
- Klabe R. M., L. Bacheler, P. Ala, S. Erickson-Viitanen and J. Meek (1998). Resistance to otease inhibitors: A comparison of enzyme inhibition and antiviral potency. *Biochemistry* **37**: 8735-8742.
- Kraft G. A. and G. Wang (1994). Synthetic Approaches to Continuous Assay of Retroviral Proteases. *Methods in Enzymology* **241**: 70-68.
- Larder B. A., B. Chesebro and D. Richman (1990). Susceptibilities of zidovudine-susceptible and -resistant human immunodeficiency virus isolates to antiviral agents determined by using a quantitative plaque reduction assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34** (3): 436-441.
- Larder B. (2001). Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *AIDS* **15**, Suppl. 5: 27-34.
- Lindsten K., T. Uhlikova, J. Konvalinka, M. Masucci and N. Dantuma (2001). Cell-base fluorescence assay for human immunodeficiency virus type 1 protease activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, No. 9: 2616-2622.
- Little S. J., E. Daar, R. D'Aquila, P. Kaiser, E. Connick, J. Whitecomb, N. Hellmann, C. Petropoulos, L. Sutton, J. Pitt, E. Rosenberg, B. Koup Waker and D. Richman (1999). Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA* **282** (12): 1177-1179.
- Liu Y., W. Kati, C. Chen, R. Tripathi, A. Molla and W. Kohlbrenner (1998). Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction. *Anal. Biochemistry* **267**: 331-335.

- Maschera B., G. Darby, G. Palu, L. Wright, M. Tisdale, R. Myers, E. Blair and E. Furfine (1996). Mutations in the viral protease that confer resistance to saquinavir increase the dissociation rate constant of the protease-saquinavir complex. *J. Biol. Chem.* **271**: 33231-33235.
- Maschera B., E. Furfine and E. D. Blair (1995). Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors. *J. Virol.* **69**: 5431-5436.
- Matayoshi E. D., G. Wang, G. Kraft and J. Erickson (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* **24**: 954-958.
- Mellors J. W., C. Rinaldo, P. Gupta et al. (1996). Prognosis of HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**: 1167-1170.
- Miller V. (2001) a. HIV Drug resistance testing technologies. International Medical Press, London.
- Miller V. (2001) b. International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **26**, Suppl. 1: 34-50.
- Modrow S., D. Falke (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Montaner J., A. Hill and E. Acosta (2001). Practical implications for the interpretation of minimum plasma concentration/inhibitory concentration ratios. *Lancet* **357**: 1438-1440.
- Morrison J. F. (1969). Kinetics of the reversible inhibition of enzyme catalysed reactions of tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **185**: 269-285.
- Morrison J. F. (1982). The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends Biochem. Sci.* **7**: 102-105.
- Nascimbeni M., C. Lamotte, G. Peytavin, R. Farinotti and F. Clavel (1999). Kinetics of antiviral activity and intracellular pharmacokinetics of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2629-2634.
- Navia M. A. et al. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**: 615-620.
- Nijhuis M., R. Schuurman, D. de Jong, J. Erickson, E. Gustchina, J. Albert, P. Schipper, S. Gulnik and C. Boucher (1999). Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* **13**: 2349-2359.

Palmer S., R. Shaker, T. Merigan (1999). Highly drug-resistant HIV-1 clinical isolates are cross-resistant to many antiretroviral compounds in current clinical development. *AIDS* **13**: 661-667.

Parkin N. T., Y. Lie, N. Hellmann, M. Markowitz, S. Bonhoeffer, D. Ho and C. J. Petropoulos (1999). Phenotypic changes in drug susceptibility associated with failure of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) triple combination therapy. *J. Infect. Dis.* **180**: 865-870.

Paolucci S., F. Baldanti, G. Campanini, M. Zavattoni, E. Cattaneo, L. Dossena and G. Gerna (2001) Analysis of HIV drug-resistant quasispecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naïve and HAART patients. *J. Med. Virol.* **65** (2): 207-217.

Perrin L. and A. Telenti (1998). HIV treatment failure: Testing for HIV resistance in clinical practice. *Science* **280**: 1871-1873.

Petropoulos C. J., N. Parkin, K. Limoli, Y. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G. Winslow, D. Capon and J. Whitcomb (2000). A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 920-928.

Piersson T., J. McArthur and R. Siliciano (2000). Reservoirs for HIV-1 mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 665-708.

Quari S. H., R. Respess, H. Weinstock, E. Beltrami, K. Hertogs, B. Larder, C. Petropoulos, N. Hellmann and W. Heneine (2002). Comparative Analysis of two commercial phenotypic assays for drug susceptibility testing of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. of Clin. Microb.* **40**: 31-35.

Richmann D. D. (2000). Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance characteristics. *Antivir. Ther.* **5**: 27-31.

Richmann D. D. (2001). HIV chemotherapy. *Nature* **410**: 995-1001.

Ristig M., M. Arens, M. Kennedy, W. Powderly, P. Tebas (2002). Increasing prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naïve individuals with established HIV-1 infection from 1996-2001 in St. Louis. *HIV Clin. Trials* **3**: 155-160.

Rodriguez-Rosado R., C. Briones and V. Soriano (1999). Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *AIDS* **13**: 1007-1014.

- Rusconi S. and M. Moroni (2000). Clinical impact of anti retroviral resistance testing: current problems and future directions. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**: 425-427.
- Sambrook J., E. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Stebbins J. and C. Debouck (1997). A microtiter colorimetric assay for the HIV-1 protease. *Anal. Biochem.* **248**: 246-250.
- Stuyver L., A. Rombout, J. Louwagie, T. Scarcez, C. Verhotstede, D. Rimland, R. Schinazi, R. Rossau (1997). Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 284-291.
- Tang J. and J. A. Hartsuck (1995). A kinetic model for comparing proteolytic processing activity and inhibitor resistance potential of mutant HIV Proteases. *FEBS Letters* **367**: 112-116.
- Tomasselli A. G. and R. Henrikson (1994). Specificity of retroviral proteases: An analysis of viral and nonviral protein substrates. *Methods in Enzymology* **241**: 279-301.
- Tomasselli A. G. and R. Henrikson (2000). Targeting the HIV Protease in AIDS therapy: A current clinical perspective. *Biochem. and Biophys. Acta* **1477**: 189-214.
- Toth M. V. and G. Marshal (1990). A simple continuous fluorometric assay for HIV Protease. *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**: 544-550.
- Vance J. E., D. LeBlanc, P. Wingfield and R. London (1997). Conformational selectivity of HIV-1 protease cleavage of X-Pro peptide bonds and its implications. *J. Biol. Chem.* **272**, No 25: 15603-15606.
- Vandamme A. M., F. Houyez, D. Banhegyi, B. Clotet, G. De Schrijver, W. De Hall, R. Harrigan, N. Hellmann, K. Hertogs, C. Holtzer, B. Larder, E. Race, J. Schmidt, R. Schuurman, E. Schulse, A. Sonnerborg, V. Miller (2001). Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir. Ther.* **6** (1): 21-39.
- Vazquez-Rosales G., G. García Lerma, S. Yamamoto, W. Switzer, D. Havlir, T. Folks, D. Richman, W. Heneine (1999). Rapid screening of phenotypic resistance to nevirapine by direct analysis of HIV-1 reverse transcriptase activity in plasma. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**: 1191-1200.
- Vasudevachari M. B., Y.-M. Zhang, H. Imamichi, T. Imamichi, J. Falloon and N. P. Salzman (1996) Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency

virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2535-2541.

Walter H., B. Schmidt, K. Korn, A.-M. Vandamme, T. Harrer, K. Überla (1999). Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors. *J. Clin. Virol.* **13**: 71-80.

Wegner S. A., S. Brodine, J. Mascola, S. Tasker, R. Shaffer, M. Starkey, A. Barile, G. Martin, N. Aronson, W. Emmons, K. Stephan, S. Bloor, J. Vingerhoets, K. Hertogs and B. Larder (2000). Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naive HIV-1 infected US military personnel. *AIDS* **14**: 1009-1015.

Wilson S. I., L. Phylip et al. (1997). Escape mutants of HIV-1 proteinase : enzymic efficiency and susceptibility to inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **1339**: 113-125.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hoffmann D., I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, U. Koszinowski, H. Gehringer, U. Strommer, K. von der Helm and H. Nitschko (2001). A novel high-throughput, fluorescence-based read-out for detecting phenotypic HIV protease resistance. *Antiviral Therapy*, **6**: Suppl. 1, 126.

Hoffmann D., I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, K. von der Helm, H. Nitschko, U. Koszinowski (2000). Detection of phenotypic HIV protease resistance by a novel high-throughput fluorescence-based assay system. *Infection* **28**: Suppl. 1, 44.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Pharmakotherapie der HIV-Infektion wurden in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte erzielt. Die derzeit eingesetzten Inhibitoren der beiden HIV-Enzyme Protease (PR) und Reverse Transkriptase (RT) haben als Kombinationstherapie zu einer deutlichen Abnahme der Mortalität von HIV-Infizierten bei verbesserter Lebensqualität geführt. Da HIV durch keine bisher verfügbare Therapie aus dem Körper eliminiert werden kann, muss die antivirale Therapie nach dem heutigen Kenntnisstand vermutlich lebenslang fortgeführt werden. Die lange Behandlungsdauer und die hohe Mutationsrate von HIV begünstigen das Auftreten von Resistenzmutationen. Tatsächlich sind klinisch manifeste Resistenzen eines der wichtigsten Probleme bei der Pharmakotherapie der HIV-Infektion.

In unterschiedlichen klinischen Situationen besteht ein Bedarf an objektiver und möglichst quantitativer Messung von HIV-Resistenzen gegen die therapeutisch eingesetzten Inhibitoren. Daher wurden zahlreiche, konzeptionell sehr unterschiedliche Testverfahren entwickelt, mit deren Hilfe Resistenz entweder genotypisch oder phänotypisch ermittelt werden kann.

Genotypische Resistenztests erkennen spezifische Mutationen in den Genen der viralen Enzyme, den resultierenden Aminosäureaustauschen sind jeweils Resistenzfaktoren zugeordnet. Durch das Mutationsmuster der HIV-Population eines Patienten (Genotyp) kann so ein individuelles Resistenzprofil erstellt werden. Die Schwierigkeit liegt hier weniger im Nachweis der Mutationen, als in der Interpretation des Mutationsmusters bezüglich der Resistenz gegen die einzelnen therapeutisch eingesetzten Inhibitoren.

Phänotypische Resistenztests messen direkt die Virusreplikation oder die Aktivität des viralen Enzyms in Gegenwart der zu untersuchenden Inhibitoren. Dies erfolgt unabhängig von den zugrundeliegenden Mutationen. Resistenzfaktoren ergeben sich direkt aus den Messergebnissen, sie sind nicht Ergebnis einer komplexen Interpretation.

Der Nachteil phänotypischer Resistenzbestimmung sind die komplexen und besonders bei Zellkultur-basierten Assays sehr aufwendigen Testabläufe. Die Bearbeitungszeit liegt hier meist bei mehreren Wochen, der Preis kommerziell angebotener Verfahren beträgt ca. 1000 € Bestimmung (Flexner, 2000).

Enzymatische phänotypische Tests sind deutlich schneller, ihre Entwicklung und Durchführung ist jedoch ebenfalls technisch anspruchsvoll. Während mehrere Verfahren zur enzymatischen Messung der Reversen Transkriptase entwickelt wurden, existiert derzeit kein Assay

zur enzymkinetischen Bestimmung phänotypischer HIV Proteaseresistenz aus Patientenmaterial.

In der Arbeitsgruppe von der Helm wurde ein Protokoll zur Expression und Reinigung der HIV Protease aus Patientenmaterial entwickelt (Gehring et al., 1999, Gehring, 2001). Nach PCR-Amplifikation des PR-Gens wird das Enzym in aktiver Form in *E. coli* exprimiert. Die Messung der Resistenz erfolgte durch Ein-Punkt Messung des in einem definierten Zeitraum gespaltenen PR-Substrates in Gegenwart der PI in verschiedenen Konzentrationen. Dieses wissenschaftlich experimentelle Verfahren war mit einem Zeitbedarf von ca. 30 min pro eingesetzter Konzentration eines PI sehr aufwendig und zudem relativ ungenau.

Da die Einführung des Assays in die Diagnostik geplant ist, war das Hauptthema vorliegender Arbeit die Etablierung eines Fluoreszenz-basierten Auswerteverfahrens zur sensitiven Bestimmung der phänotypischen HIV Proteaseresistenz. Die jeweils untersuchte HIV Protease spaltet dabei ein mit einem Fluorophor markiertes Substrat, die registrierte Fluoreszenzzunahme ist proportional zum Stoffumsatz.

Die Testbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Konzentration der beteiligten Reaktionspartner wurden zunächst in einem Küvettenformat entwickelt. Nach Etablierung von Testbedingungen, die einen stabilen Testablauf mit reproduzierbaren Resistenzergebnissen gewährleisten, wurde der Assay auf 96-Well Mikrotiterplattenformat übertragen. Das vollständige Resistenzprofil einer HIV Protease gegen die therapeutisch eingesetzten Inhibitoren kann auf einer einzelnen Mikrotiterplatte bestimmt werden. Somit erfordert der gesamte Resistenztest von der RNA Extraktion bis zur enzymatischen Fluoreszenzmessung 7-8 Arbeitstage und ca. 300 € Materialkosten. Gegenüber Resistenztests in Zellkultur ist dies deutlich schneller und preisgünstiger.

In beiden Formaten wurden die Ergebnisse durch Vergleich mit Daten der im Max von Pettenkofer-Institut routinemäßig durchgeführten genotypischen Resistenzbestimmung validiert. Das Patientenmaterial wurde dabei so ausgewählt, dass möglichst das gesamte Spektrum von sensitiv bis hochresistent abgedeckt war. Geno- und phänotypische Resistenzfaktoren zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung.

Die enzymkinetisch ermittelten Resistenzfaktoren waren meist deutlich höher als die genotypischen Vergleichsdaten. Angaben in der Literatur bestätigen dies: So beobachteten Maschera et al., (1995) im enzymatischen Proteaseassay höhere Resistenzfaktoren gegenüber Zellkultur-basierten phänotypischen Tests. Dies bewirkt eine höhere Sensitivität bezüglich der De-

tektion sowohl von niedrigen Resistenzfaktoren als auch von Subpopulationen mit geringem prozentualen Anteil.

Phänotypische Resistenzmessung kann mit dem vorliegenden Test für einen größeren Patientenkreis verfügbar gemacht werden. Durch die enge Kooperation mit der Infektionsambulanz der Medizinischen Poliklinik der Universität München bestehen gute Voraussetzungen für die klinische Prüfung des Assays in der Virusdiagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes. Dies erleichtert die weitere Validierung des neu etablierten Verfahrens an Patientenmaterial, sowie die Untersuchung von Resistenzen gegen neue Proteaseinhibitoren vor der Verfügbarkeit genotypischer Daten.

DANKSAGUNG

Für die Bereitstellung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit danke ich Prof. U. Koszinowski. In zahlreichen Diskussionen hat er mir neue Denkanstöße und Anregungen gegeben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. W. Machleidt und Dr. I. Machleidt, in deren Arbeitsgruppe ich den Fluoreszenzassay etabliert habe. Dr. Machleidt arbeitete mich dabei engagiert in die Methoden und theoretischen Hintergründe ein. Sie und Prof. Machleidt haben die Planung der Versuche stets sowohl in theoretischer als auch technischer Hinsicht unterstützt. Auch für den Transfer des Fluoreszenzassays in Mikrotiterplattenformat und konzeptionelle Fragen des gesamten Tests waren sie durch ihre große Erfahrung und Kompetenz in der Enzymologie und der gesamten Biochemie eine große Hilfe.

Prof. K. von der Helm verdanke ich viele nützliche Hinweise und Ratschläge, die er mir während der regelmäßigen Laborbesprechungen gegeben hat. Dadurch brachte er seine große Erfahrung in das Projekt ein, das er stets kritisch und mit großem Interesse verfolgte. Die rekombinante Expression der HIV Protease konnte ich in seinem Labor durchführen und dabei auf alle dafür notwendigen Geräte zugreifen.

Dr. H. Nitschko möchte ich für die Betreuung der praktischen Laborarbeit danken. Er war mein wichtigster Ansprechpartner in technischen und theoretischen Fragen und hat mich dabei sehr engagiert zum wissenschaftlichen Denken und Arbeiten angeleitet. Besonders danke ich ihm für die Korrekturarbeiten des Manuskripts dieser Arbeit.

Frau H. Gehringer möchte ich für die Einarbeitung, Frau S. Seelmeir für die Unterstützung und große Hilfsbereitschaft in der täglichen Laborarbeit danken.

Die Arbeit konnte nur durch die Mithilfe der Diagnostikabteilung des Max von Pettenkofer-Institutes durchgeführt werden. PD J. Eberle stellte mir genotypische Resistenzdaten zu den in dieser Arbeit untersuchten Patienten zur Verfügung. Frau R. Scherbauer und Frau A. Wurl führten die Amplifikation des Protease Gens durch. Schließlich danke ich Frau P. Späth für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts.

LEBENS LAUF

Zur Person

Dieter Hoffmann

geboren am 12.10.1971 in Temeschburg

Schul Ausbildung

1979-1981

Grundschule Nikolaus Lenau in Temeschburg

1981-1982

Grundschule Haimhauserstraße in München

1982-1989

Ernst-Mach-Gymnasium Haar

1989-1991

Gymnasium Ottobrunn, Leistungsfächer: Chemie/Physik

1991

Abitur, Note: 1,3

Hochschulstudium

WS 1991 - SS 1992

Studium der Chemie an der TU München

WS 1992

Beginn des Studiums der Humanmedizin, LMU München

September 1994

Ärztliche Vorprüfung

August 1995

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 1998

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 1998	Beginn des Praktischen Jahres: 1. Trimester: Chirurgie (Krankenhaus Neuperlach)
August 1998 - November 1998	2. Trimester: Radiologie (Institut für Radiologische Diagnostik der LMU, Klinikum Innenstadt)
August 1998	USMLE, Step 2
November 1998 - Februar 1999	3. Trimester: Innere Medizin (3. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern)
April 1999	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

Dezember 1999	Beginn der Promotionsarbeit: „Ein neuartiges enzymatisches Auswerteverfahren für die <i>in vitro</i> Detektion phänotypischer HIV-1 Proteaseresistenz“ am Lehrstuhl für Virologie, Max von Pettenkofer-Institut Betreuer: Prof. Dr. med. U. Koszinowski
Seit Januar 2001	AiP-Tätigkeit am Lehrstuhl für Virologie am Max von Pettenkofer-Institut, LMU München. Ausbildung in den Abteilungen für Hepatitis-, HIV-, und allgemein virologische Diagnostik
Juni 2001	Posterpräsentation im “5th International Workshop on HIV Drug Resistance & Treatment Strategies”, Scottsdale, Arizona
August 2002- August 2003	Postdoc-Stipendium im Rahmen des “International Emerging Infectious Diseases Laboratory Fellowship Program; Arbeitsgruppe: Dr. W. Heneine, Molecular Epidemiology and Zoonoses Section, Division of AIDS, CDC, Atlanta.

