

Aus dem Lehrstuhl Virologie
des Max von Pettenkofer-Instituts
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Koszinowski

**Etablierung einer
HIV-Sequenzdatenbank
im Max von Pettenkofer-Institut**

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

vorgelegt von
Sebastian Ulrich Braun
aus
Würzburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Franz-Josef von Sonnenburg

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Obermeier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	6
1.1. HIV-Epidemiologie.....	6
1.2. Die HIV-Replikation.....	7
1.2.1. Der virale Replikationszyklus.....	7
1.2.2. Die Virusenzyme und ihr Aufbau.....	8
1.3. HIV-Therapie.....	10
1.3.1. Nukleosid- und Nukleotid-artige Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI).....	11
1.3.2. NNRTI.....	11
1.3.3. Proteaseinhibitoren.....	12
1.3.4. Neu entwickelte Substanzen.....	13
1.3.5. Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)	15
1.4. Mutationen und Resistenzentwicklung.....	16
1.4.1. Mutationen.....	17
1.4.2. Resistenzmechanismen und Substanz-spezifische Mutationen	17
1.4.3. Virale Fitness.....	18
1.5. Resistenztestung.....	19
1.6. Virus-Subtypen und Resistenzentwicklung.....	19
1.7. Resistenztestung im Max von Pettenkofer-Institut.....	20
2. Zielsetzung.....	21
3. Material und Methoden.....	21
3.1. Ausgangsdaten.....	21
3.2. Sequenzierung der Patientenproben und Weiterverarbeitung.....	22
3.3. Erstellung einer HIV-Datenbank.....	24
3.4. Import der Sequenzierungsdaten in die Datenbank.....	27
3.5. Umgang mit Patientendaten.....	28
3.6. Weiterverarbeitung der Sequenzierungsdaten.....	28

3.6.1.	Degenerierte Basen.....	29
3.6.2.	Informationserhalt durch IUPAC-Code.....	30
3.6.3.	Sicherstellung eines maximalen Informationsgehalts.....	30
3.7.	Struktur der neu geschaffenen MvP-HIV-Datenbank.....	33
3.8.	Auswertungen.....	33
4.	Ergebnisse.....	34
4.1.	Prävalenz häufiger Mutationen.....	34
4.1.1.	MvP-Datenbank.....	34
4.1.2.	Vergleich mit der Stanford HIV Drug Resistance Database.....	36
4.2.	Sequentielles Auftreten von Mutationen unter antiretroviraler Therapie.....	38
4.2.1.	Tenofovir und die Mutation K65R.....	39
4.2.2.	Zidovudin (AZT) und die Mutation M41L.....	39
4.2.3.	Atazanavir (PI) und Mutation I50L.....	40
4.3.	Einfluss neu beschriebener HIV-1-RT-Mutationen auf die Resistenz.....	40
4.4.	Resistenzpfade.....	44
4.5.	Kombinationen von Mutationen.....	46
4.6.	Subtypisierung.....	49
4.6.1.	Prävalenz verschiedener Subtypen in der MvP-Datenbank.....	50
4.6.2.	Prävalenz verschiedener Subtypen in der Stanford Datenbank.....	50
4.6.3.	Polymorphismen an RT-Codon 39.....	50
5.	Diskussion.....	54
5.1.	Prävalenz häufiger Mutationen.....	54
5.2.	Sequentielles Auftreten von Mutationen unter antiretroviraler Therapie.....	57
5.3.	Einfluss neu beschriebener HIV-1-RT-Mutationen auf die Resistenz.....	58
5.4.	Resistenzpfade.....	61
5.5.	Kombinationen von Mutationen.....	62
5.6.	Subtypisierung.....	63
5.6.1.	Prävalenz verschiedener Subtypen.....	63
5.6.2.	Spezielle Polymorphismen an RT-Codon 39.....	64

6.	Zusammenfassung	64
7.	Abkürzungsverzeichnis	67
8.	Quellenverzeichnis	69
9.	Verzeichnis der Bilder und Tabellen	83
10.	Anhang	85
11.	Danksagung	101
12.	Lebenslauf	102

1. Einleitung

1.1. HIV-Epidemiologie

Seit der Erstbeschreibung des Krankheitsbildes AIDS im Jahre 1981 (Centers of Disease Control 1982) und der Entdeckung des Retrovirus HIV-1 im Jahr 1983 (Barré-Sinoussi 1983) und HIV-2 im Jahr 1986 (Clavel 1986) als auslösenden Erregern schreitet die Krankheit trotz aller wissenschaftlicher Bemühungen um Heilungsmöglichkeiten noch immer fort. Mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Oktober 2008 an die französischen Virologen Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi für ihre Entdeckung des HI-Virus rückte die Progredienz der Pandemie einmal mehr in das Blickfeld der Öffentlichkeit. Präventionsmaßnahmen, die Erforschung des viralen Replikationszyklus sowie die Entwicklung neuer antiretroviraler Behandlungsmöglichkeiten nehmen deshalb unverändert einen hohen Stellenwert in der Medizin ein. Die medizinische Bedeutung und die volkswirtschaftliche Tragweite der HIV-Infektionskrankheit kann anhand einiger epidemiologischer Daten leicht ermessen werden. So sind alleine in der Bundesrepublik Deutschland zum Ende des Jahres 2008 geschätzte 63500 Menschen mit HIV infiziert. 10500 von ihnen leben bereits mit AIDS. Seit 2001 steigt die HIV-Inzidenz von Jahr zu Jahr kontinuierlich an. In Bayern leben 9500 Personen mit einer HIV-Infektion (Robert-Koch-Institut, „HIV/AIDS in Bayern (Stand: Ende 2008)“ bzw. „HIV/AIDS in Deutschland (Stand: Ende 2008)“). Die globale Bedeutung wird ersichtlich aus Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Juli 2008. Danach lebten weltweit etwa 33 Millionen HIV-positive Menschen bei einer Zahl von etwa 2,7 Millionen Neuinfektionen im Jahr 2007. Der Hauptfokus der Pandemie liegt überwiegend in bevölkerungsreichen und strukturschwachen Regionen Afrikas, Süd- und Südostasiens sowie Lateinamerikas. Durch die Bemühungen zur verbesserten Betreuung HIV-Infizierter sowie zur Bereitstellung antiretroviraler Medikamente in den HIV-Krisengebieten konnte das Fortschreiten der Krankheit in vielen Fällen verzögert werden. Dennoch ist beispielsweise Simbabwe das einzige südafrikanische Land, in dem die Prävalenz der Immunschwächekrankheit im erwachsenen Teil der Bevölkerung zurückgegangen ist (UNAIDS; **Bild 1**). Auch ist die weiter ansteigende Zahl an Neuinfektionen besorgniserregend.

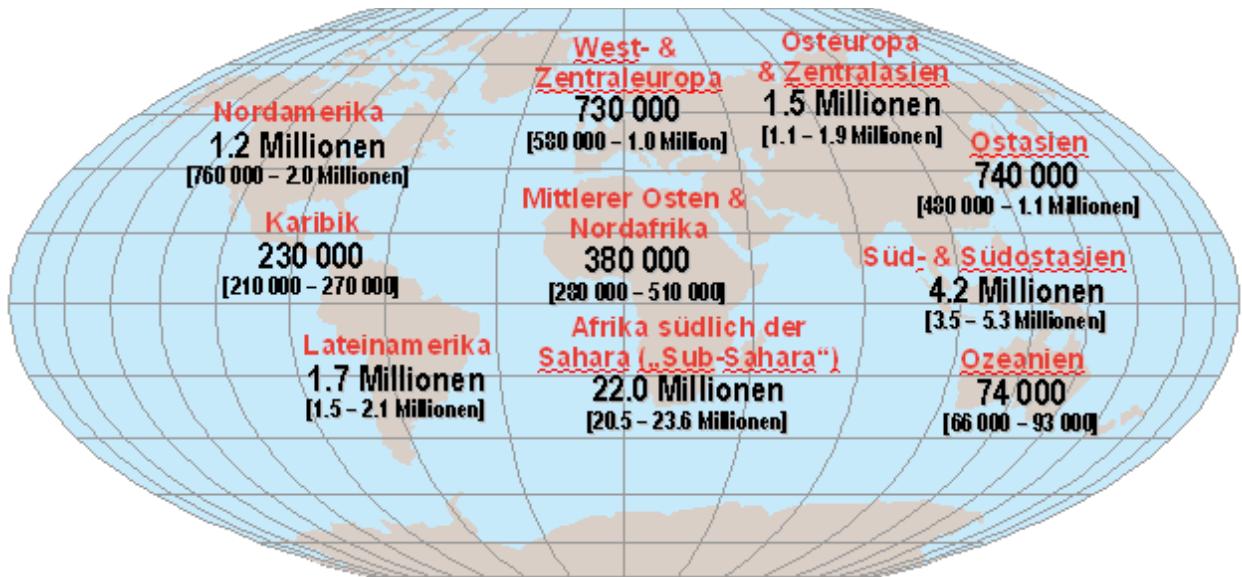


Bild 1) UNAIDS 2008, Anzahl an HIV-Infizierten weltweit (bearbeitet)

1.2. Die HIV-Replikation

Die Identifizierung des HI-Virus als Auslöser von AIDS stand am Anfang der Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten gegen die Infektionskrankheit. Die Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten ging dabei stets auch mit der immer präziseren Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Erreger und menschlichem Organismus einher. Dies schloss Kenntnisse immunologischer Vorgänge genauso ein wie Einblicke in das virale Genom (Liu 1997). Vor allem aber ist das immer genauere Verständnis des viralen Replikationszyklus eine unerlässliche Basis für die Entwicklung antiretroviraler Medikamente.

1.2.1. Der virale Replikationszyklus

Der Entwicklungszyklus des Virus (**Bild 2**) besteht im Wesentlichen aus dem Eintritt in die Wirtszelle, der Replikation des viralen Genoms und der Freisetzung und Reifung infektiöser Viruspartikel. Für den Eintritt des Virus in die humane Wirtszelle bindet zunächst das virale Hüllprotein gp120 an den zellulären Oberflächenrezeptor CD4, daneben sind weitere Proteine wie CXCR4 oder CCR5 als Korezeptoren beteiligt. Wechselseitige Interaktionen bewirken eine Konformationsänderung und damit analog einer Schnappfeder die Bindung an die Zielzelle. Es kommt zur Membranfusion (Rubbert, www.hiv.net). Dann ergießt sich die virale RNS in das Innere der humanen Zelle, was als „uncoating“ bezeichnet wird. Die nun folgende reverse Transkription ist der wesentliche Schritt, um die Umwandlung der HIV-RNS in replikationsfähige DNS zu bewerkstelligen. Das hierfür verantwortliche Enzym, die Reverse Transkriptase (RT), bewirkt die Transkription zu einer doppelsträngigen DNS, welche das Virusgenom enthält. Diese wird durch die

virale Integrase in den Zellkern aufgenommen und in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Erst nach Aktivierung durch Zytokine werden Virusgene transkribiert, so dass Struktur- und Regulationsproteine exprimiert und Vorläuferproteine der späteren infektiösen Virionen gebildet werden können. Durch Spaltung dieser sog. Präkursormoleküle werden im Rahmen des "assembly" durch das zweite essenzielle virale Enzym, die Protease (PR), die viralen Proteine zu pathogenen Partikeln zusammengebaut. Bei der Loslösung dieser Virionen von der Wirtszelle, dem "budding", werden zelluläre und viruscodierte Proteine in die Virushülle eingebaut. Anschließend kommt es extrazellulär zu einer Reifung der Erreger.

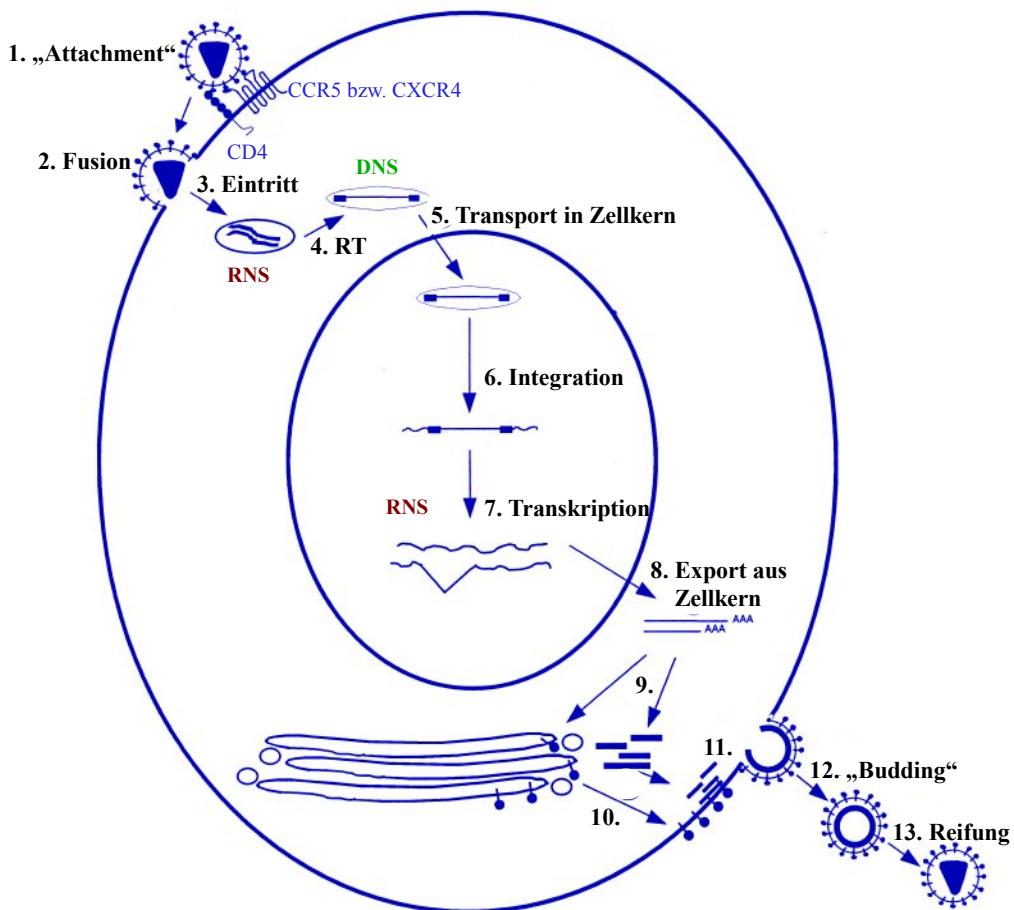


Bild 2) Der HIV-Replikationszyklus (nach Weiss 2000):

1. Anlagerung an CCR5/CXCR4.
2. Fusion mit der Zellmembran.
3. Eintritt in die Zelle.
4. Reverse Transkription.
5. Transport in den Zellkern.
6. Integration des DNS-Provirus.
7. Transkription der RNS.
8. Export der RNS aus dem Zellkern.
9. Translation und „Processing“.
10. Membrantransport.
11. „Assembly“.
12. „Budding“.
13. Reifung.

1.2.2. Die Virusenzyme und ihr Aufbau

Im Replikationszyklus des HI-Virus nehmen Reverse Transkriptase und Protease eine Schlüsselposition ein. Das erstgenannte Enzym ermöglicht es dem Erreger, seine RNS durch Übersetzung in DNS mit der Wirts-DNS kompatibel zu machen und zu replizieren. Die Protease verarbeitet die Virusproteine nach ihrer Translation und übernimmt den Zusammenbau zu

funktionsfähigen, pathogenen Partikeln. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die Strukturen der beiden Virusenzyme gegeben werden.

Die **Reverse Transkriptase (Bild 3a)** ist ein Heterodimer, enthält zwei Untereinheiten und hat eine Länge von 560 Aminosäuren. Die p66-Untereinheit umfasst die Codons 1 bis 300 des Enzyms und enthält die aktiven Zentren von Polymerase und RNaseH. Ihr Polypeptid-Rückgrat ähnelt in seiner räumlichen Anordnung Fingern und Handfläche (Codons 1 bis 235) sowie Daumen einer rechten menschlichen Hand (Calmy 2004; Clavel 2004). Die zweite Untereinheit, p51, ist hingegen nicht enzymatisch aktiv, sondern dient als eine Art Baugerüst des Enzyms. Resistenz-relevante Mutationen entstehen hauptsächlich in "Daumen" und restlichen "Fingern" von p66.

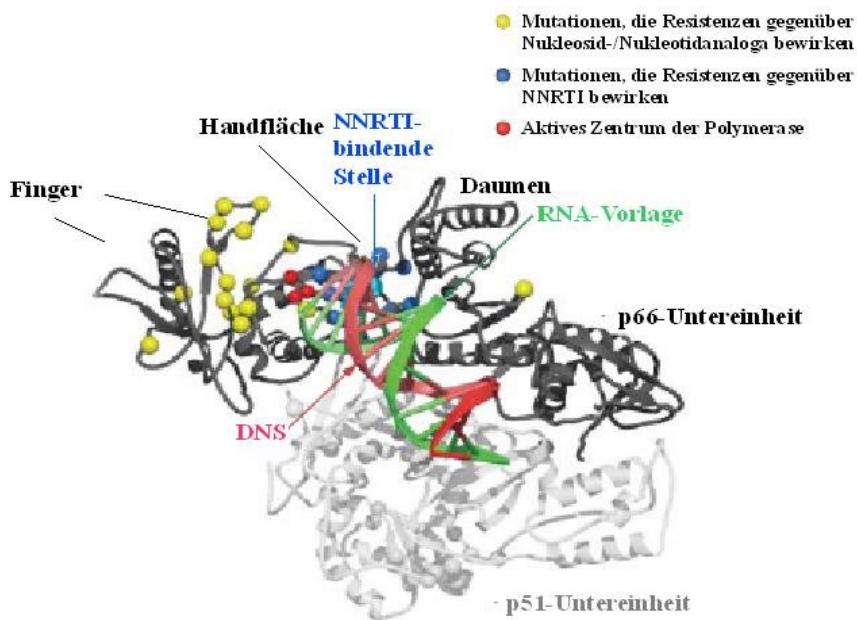


Bild 3a) Struktur der HIV-1-Reversen Transkriptase (nach Clavel 2004):

Heterodimer, bestehend aus 2 Untereinheiten: p66 enthält das aktive Zentrum, p51 ist nicht direkt an der Polymerisation beteiligt. Gelb markiert NRTI-relevante Mutationen, blau NNRTI-relevante Mutationen. Rot markiert ist das aktive Zentrum.

Die **Protease (Bild 3b)** als zweites HIV-Schlüsselenzym ist ein Homodimer, weist also zwei strukturell identische Untereinheiten auf. Diese bestehen jeweils aus 99 Aminosäuren und sind nicht-kovalent aneinander gebunden. Das aktive Zentrum erkennt verschiedene Polypeptid-Sequenzen und verarbeitet sie zu funktionsfähigen viralen Proteinen inklusive der Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und Protease selbst. An einem der Berührungsstellen der beiden Untereinheiten bildet das Enzym eine flexible, klappenartige Struktur; diese "flap" umfasst die Codons 44 bis 56 und bedeckt das aktive Zentrum nach der Substrat-Bindung (Chen 1994; Shafer, "Genotypic testing for HIV-1 Drug Resistance (2003)"). Mutationen können je nach Lokalisation die Kinetik des Enzyms ändern und dadurch seine Funktionsfähigkeit positiv oder negativ

beeinflussen, können aber auch die Bindung von antiretroviralen Medikamenten mindern oder hemmen.

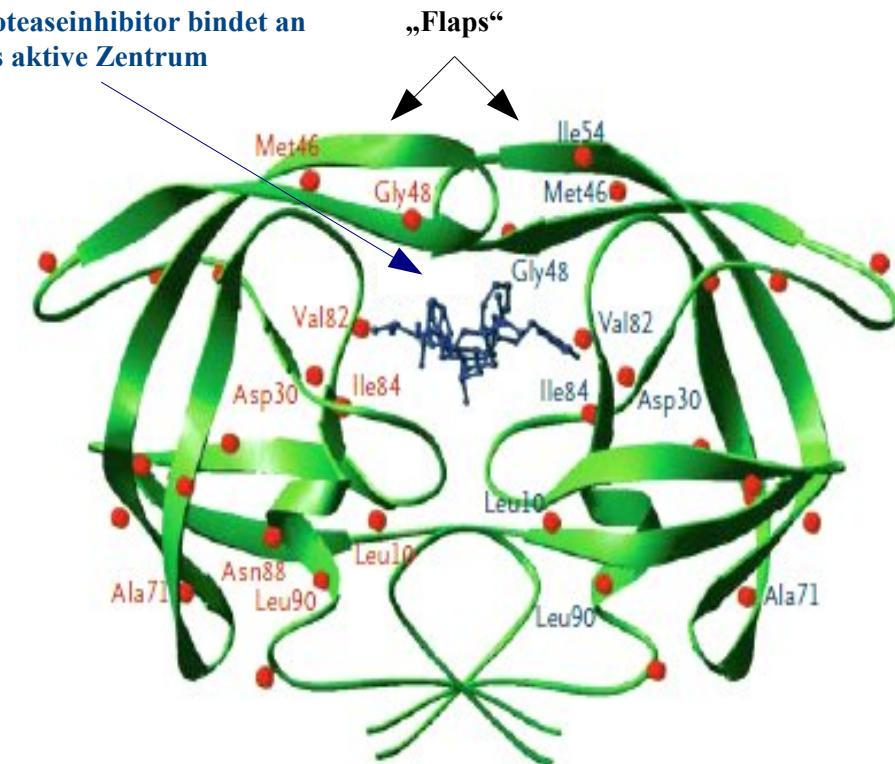


Abbildung 3b) Struktur des Protease-Dimers (nach Clavel 2004):

Abgebildet sind die beiden Untereinheiten des Protease-Homodimers, mit denen ein Proteaseinhibitor (Ritonavir) über das aktive, Substrat-bindende Zentrum verbunden ist. Korrespondierende Stellen sind für die eine Untereinheit rot und die andere blau markiert.

Beispiel: Met 46 und Met 46 korrespondieren miteinander.

1.3. HIV-Therapie

Nach Infektion mit HIV ist eine Eradikation des Erregers aus dem menschlichen Körper derzeit nicht möglich. Vorherrschendes Therapieziel bei infizierten Patienten ist daher die weitestgehende Supprimierung der Viruslast unter die laborchemisch nachweisbare Grenze. Die Unterbrechung des viralen Replikationszyklus ist für dieses Ziel die derzeit wichtigste therapeutische Strategie. Jede der beschriebenen Entwicklungsstufen birgt die Möglichkeit, durch gezielte Blockade die Vermehrung des Virus zu hemmen. Aus der intensiven Erforschung dieser Replikationsschritte ergaben sich deshalb immer wieder auch neue therapeutische Ansatzmöglichkeiten. Daneben werden auch immunmodulatorische Substanzen auf ihre Wirksamkeit bei der HIV-Infektion untersucht.

Die wichtigsten antiretroviralen Substanzklassen sind Inhibitoren der Reversen Transkriptase sowie der Protease. Seit im Jahr 2003 das erste Medikament einer anderen Wirkstoffklasse, der Fusionshemmstoff T-20, erprobt wurde, fanden mit dem Korezeptorantagonisten Maraviroc und

dem Integrasehemmer Raltegravir im Jahr 2007 zwei neue Wirkstoffklassen Eingang in die antiretrovirale Therapie.

1.3.1. Nukleosid- und Nukleotid-artige Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)

Das erste antiretrovirale Medikament, Zidovudin (AZT), wurde im Jahre 1986 zugelassen und zeigte erstmals einen nachweisbaren klinischen Erfolg bei der Behandlung HIV-Infizierter (Hardman 1998). Es gehört zur Substanzklasse der Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI), die bis zur Einführung der Proteaseinhibitoren im Jahr 1995 die einzigen Medikamente zur Behandlung der HIV-Infektion waren. Dabei unterscheidet man generell nukleosidische oder nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), die in die wachsende virale DNS eingebaut werden und als falsche Bausteine zum Kettenabbruch führen, von nicht-nukleosidischen RTI (NNRTI), welche die Konformation des Virusenzyms verändern und auf diese Weise seine Funktionsfähigkeit beeinflussen.

Die NRTI imitieren die für die Elongation der wachsenden proviralen DNS-Kette benötigten Desoxynukleosid-Triphosphate. Ihnen fehlt jedoch als wesentlicher Unterschied zu den natürlich vorkommenden Nukleotiden eine Hydroxylgruppe, wodurch sich keine 3'-5'-Phosphodiesterbindung ausbilden kann, der Anbau weiterer Substrate verhindert und der Kettenabbruch eingeleitet wird. Es kommt zum Arrest der viralen DNS-Synthese.

Alle zugelassenen NRTI sind sog. Prodrugs, müssen also zunächst von zellulären Kinasen phosphoryliert werden, ehe sie dem Enzym als Substrat dienen können. Dabei unterscheidet man **Nukleotidanaloga**, also Wirkstoffe, die bereits eine Phosphorgruppe aufweisen und somit noch zweifach phosphoryliert werden müssen, von **Nukleosidanaloga**, bei denen eine Dreifach-Phosphorylierung erfolgen muss (Kasper 2005).

Aktuell sind sechs Substanzen als **Nukleosidanaloga** zur antiretroviroalen Therapie zugelassen. In chronologischer Reihenfolge ihrer Zulassung gehören hierzu neben Zidovudin (AZT; Zulassung 1987) Didanosin (ddI; 1991), Stavudin (d4T; 1996) Lamivudin (3TC; 1996), Emtricitabin (FTC; 2003) und Abacavir (ABC; 2004). Zalcitabin (ddC), wurde als dritter NRTI 1992 zugelassen, aber im Juni 2006 wegen seiner schwachen Wirksamkeit und starker Nebenwirkungen vom Markt genommen (Hoffmann, „HIV.net 2007“; Kasper 2005). Als einziges **Nukleotid-Analogon** ist Tenofovir (TDF) seit 2001 zugelassen (Gallant 2006).

1.3.2. NNRTI

Die etablierten nicht-nukleosidischen RTI wurden 1996 bis 1998 zugelassen und sind eine sehr heterogene Substanzklasse. Sie hemmen die reverse Transkriptase von HIV-1 durch nicht-

kompetitive allosterische, d.h. direkte Bindung, was zu einer Konformationsänderung des Enzyms und einer Behinderung der Replikation führt (Shafer, "Genotypic testing for HIV-1 Drug Resistance (2003)"). Eine Phosphorylierung der Wirkstoffe ist nicht nötig, um ihre selektive Wirkung zu entfalten. Bisher in Gebrauch waren Delavirdin (DLV), Efavirenz (EFV) und Nevirapin (NVP). Die hydrophobe NNRTI-Bindungsstelle veränderte sich im Laufe der Virus-Evolution in deutlich größerem Maße als die Nukleotid-Kopplungsstelle, so dass beispielsweise die HIV-1-Gruppe O sowie HIV-2 resistent sind gegen die meisten Medikamente aus dieser Substanzklasse. In Monotherapie führen NNRTI zu rascher Resistenzentwicklung binnen Wochen und sind deshalb immer mit Präparaten anderer Substanzklassen zu kombinieren.

Etravirine (Intelence bzw. TMC125) wurde am 18. Januar 2008 als neuer NNRTI-Inhibitor zugelassen. In vitro zeigte sich die Substanz auch gegen NNRTI-resistente Stämme (inklusive Mutationen der Positionen 100, 103 und 188) wirksam. Die Zulassung beschränkt sich auf die Kombinationstherapie mit anderen Wirkstoffen (FDA 2008).

1.3.3. Proteaseinhibitoren (PI)

Um aus den einzelnen transkribierten Vorläufermolekülen funktionsfähige Proteine zu bilden, ist für das Virus die Protease essenziell. 1995 wurden die ersten Hemmstoffe dieses Enzyms für die Therapie zugelassen, die antiretrovirale Therapie damit um eine neue Substanzklasse erweitert und eine Kombination verschiedener Medikamentenklassen möglich.

Der Großteil der zugelassenen PI gehört zu den **peptidomimetischen Inhibitoren**. Sie ahmen die Peptidstruktur der natürlichen Substrate der Protease nach. Erfährt das aktive Zentrum unter dem Selektionsdruck der PI eine Konformationsänderung, kann das Virus allerdings gegen eine ganze Substanzklasse resistent werden. Hoffnung gibt hier die Entwicklung neuerer Medikamente, die nicht-peptidisch das Virusenzym blockieren.

In der Reihenfolge ihrer Zulassung zählen Saquinavir (SQV; Erstzulassung 1995), Indinavir (IDV; 1996), Ritonavir (RTV; 1996), Nelfinavir (NFV; 1998) und Amprenavir (APV; 2000) zu den ersten Proteaseinhibitoren; es folgten Lopinavir/Ritonavir, ein Kombinationspräparat (LPV; 2001), Atazanavir (2004) und Fosamprenavir (FPV; 2004). Letzteres ersetzte als Weiterentwicklung Amprenavir.

Ritonavir verstärkt die Wirkung anderer Proteaseinhibitoren, indem es durch Hemmung des Cytochrom-P450-Enzym-Systems den Abbau anderer Pharmaka inhibiert und dadurch ihren Wirkspiegel erhöht („Boosterung“). Darunavir ist ein neuer Proteaseinhibitor, der in Studien eine sehr gute Wirkung auch bei resistenten Viren zeigte. Im Juni 2006 wurde die Substanz in

Kombination mit Ritonavir in den USA zugelassen, in Deutschland im Februar 2007 (Aschoff 2007; Lode 2007).

Als erste Substanz einer **neuen** Generation von **Proteaseinhibitoren** wurde Ende 2005 Tipranavir in Europa zugelassen. Als wesentlicher Unterschied zu den älteren Medikamenten besitzt die Substanz keine peptid-ähnliche Struktur und ist damit der erste nicht-peptidische PI. Aufgrund einer guten Wirksamkeit auch bei multiresistenten Virusstämmen ist Tipranavir ein wichtiger Bestandteil der sog. Salvage-Therapie (Poppe 1997).

1.3.4. Neu entwickelte Substanzen

Neben Hemmstoffen der viralen Protease und Reversen Transkriptase bieten sich auch andere Phasen des Infektions- und Replikationswegs des Erregers als therapeutische Ansatzpunkte an. Zu den neuesten antiretroviralen Wirkstoffen zählen dementsprechend Substanzen, die die Bindung des Virus an den Rezeptor oder an Korezeptoren der Zielzelle behindern oder die Fusion der Membranen stören. Sie werden, je nach Wirkmechanismus, als Attachment-Inhibitoren, Korezeptor-Antagonisten oder Fusionsinhibitoren bezeichnet. Der Fusionsinhibitor Enfuvirtide (T-20) wurde als erstes Präparat einer neuen Wirkstoffklasse im Jahr 2003 für die Therapie zugelassen (Gulick 2003), 2007 folgte der Korezeptorantagonist Maraviroc. Mit Zulassung von Raltegravir Ende 2007 wurde erstmals ein Hemmstoff der Integrase für die antiretrovirale Therapie etabliert (Hoffmann C. 2008).

Bei der Fusion von Virus- und Zellmembran spielen die sog. heptad-repeat-(HR-) Domänen des HIV-Oberflächenproteins gp41 eine wesentliche Rolle. Durch Bindung an diese Regionen, HR1, verhindert **Enfuvirtide (T-20)** die Annäherung der Membranen von Virus und Zielzelle und damit die Fusion. T-20 ist additiv zur normalen hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) zugelassen. Es wird von einer relativ schnellen Resistenzentwicklung berichtet, die aber mit einer reduzierten viralen Fitness einhergeht (Lazzarin 2003; Stanfield-Oakley 2003; Menzo 2004; Thole 2008). Daneben gibt es wenige wirkliche Neuerungen unter den Fusionsinhibitoren. So wird an neueren Substanzen wie TRI-1144 und Sifuvirtide geforscht. Die neuesten Wirkstoffe aus dieser Substanzklasse, sog. "small molecule"-Fusionsinhibitoren, sollen oral verfügbar sein. Ihre antiretrovirale Wirksamkeit wird näher erprobt.

Überdies wird an Molekülen geforscht, welche die Bindung des Virus an die Zellrezeptoren verhindern, sog. **Anlagerungs-** oder **Attachment-Inhibitoren**. Der CD4-Rezeptor wird durch verschiedene Mechanismen blockiert. TNX-355 wirkt beispielsweise als monoklonaler Antikörper, bindet an CD4 und induziert offenbar eine Konformationsänderung, so dass die weitere Bindung an

CCR5 und CXCR4 behindert wird. BMS-488043 als weiteres Beispiel bindet spezifisch und reversibel an das HIV-Oberflächenprotein gp120 (Norris 2006; Hanna 2004).

Eine weitere Wirkstoffklasse stellen die **Korezeptorantagonisten** dar. HI-Viren benutzen meist entweder sog. CCR5- oder CXCR4-Korezeptoren für das Eindringen in die Zelle. Die entsprechenden Virusvarianten nennt man R5- oder X4-Viren. Daneben gibt es aber auch Viren mit einer Affinität zu beiden Korezeptoren oder auch Mischpopulationen. Zu Beginn der HIV-Infektion herrschen meist R5-Viren vor, beim Fortschreiten der Krankheit kommt es meist zu einem Wechsel zu den virulenteren X4-Viren. CCR5- oder CXCR4-Antagonisten machen sich mit verschiedenen Mechanismen die beschriebene Bindung an Korezeptoren als Wirkungsstelle zu nutze.

So blockiert der **CCR5-Antagonist Maraviroc** (=Celsentri) als synthetischer Ligand den CCR5-Korezeptor und verhindert die Infektion mit CCR5-tropen Viren. Im August 2007 wurde die Substanz von den US-amerikanischen Gesundheitsbehörden und im September 2007 auch in der Europäischen Union zugelassen. Sie ist in der Anwendung bisher auf die Kombinationstherapie bei vortherapierten Patienten mit multiresistenten Virusstämmen beschränkt (European Medicines Agency 2007). Resistenzen werden bereits berichtet; so bewirken Mutationen an der Interaktionsstelle des Hüllproteins mit den Rezeptoren eine volle Resistenz (Fätkenheuer 2005; Flepp 2008; Antiviral Drugs Advisory Committee 2007).

Ein weiterer CCR5-Hemmstoff, Vicriviroc, wird derzeit in klinischen Studien getestet. Nach Boosterung mit Ritonavir zeigte sich eine Senkung der Viruslast. Die Substanz Pro-140, ein monoklonaler Antikörper gegen CCR5, durchläuft Phase-II-Studien und scheint eine gewisse Wirksamkeit zu haben. Ein allgemeines Problem der CCR5-Antagonisten könnte allerdings der Wechsel der R5-Viren zum CXCR4-Korezeptor zu sein, der mit einer rascheren Progression der Krankheit vergesellschaftet ist (Connor 1997, Gulick 2006, Murga 2006).

Gegen **CXCR4**, den zweiten Korezeptor, wurden weniger Substanzen entwickelt als gegen CCR5. Mit AMD 11070 als Monotherapeutikum konnte beispielsweise in klinischen Studien eine Senkung der Viruslast erreicht werden (Wong R. 2007).

Die **Integrase** als drittes Schlüsselenzym des HIV-Replikationszyklus gewinnt derzeit immer mehr Relevanz als therapeutischer Ansatzpunkt. Sie ist essenziell für die Integration der Virus-DNS in die DNS der Wirtszelle. Unter anderem können Bindung der DNS, Prozessierung, Strangtransfer und Lückenreparatur als Ansatzpunkte für eine gezielte Unterbrechung dieses Replikationsschrittes dienen. Bislang gilt die Integrase als Virus-eigenes Enzym, da sie in menschlichen Zellen nicht

nachgewiesen werden konnte. Deshalb lässt die Hemmung des Enzyms ein günstiges Nebenwirkungsprofil erwarten (Lataillade 2006). Als erstes Medikament dieser Substanzklasse wurde **Raltegravir** (= Isentress) am 21. Dezember 2007 in der europäischen Union zugelassen. In Phase-III-Studien wirkte der Integrasehemmer breit gegen R5- und X4-trope HI-Viren des Typs 1 und sogar gegen HIV-2. In Studien zeigte sich bei Patienten mit langjähriger HAART unter Behandlung mit Raltegravir ein deutlicher Abfall der Viruslast, allerdings wurde eine schnelle Resistenzentwicklung beobachtet (Hoffmann C. 2008; Steigbigel 2007; Deutsche AIDS-Hilfe 2006).

Ebenfalls zu den relativ neu entdeckten antiretroviralen Wirkmechanismen gehört die Hemmung der Reifung. Diese Maturations- oder **Reifungsinhibitoren** greifen spät im viralen Replikationszyklus ein und hemmen die Knospung neuer Viren. Für die Substanz Bevirimat (PA-457) konnte nachgewiesen werden, dass sie die Umwandlung des Kapsid-Vorläufer-Proteins in das reife Kapsid-Protein verhindert und dadurch unreife, nicht-infektiöse Viren entstehen lässt. Es befindet sich derzeit in klinischen Studien (Li 2003, Martin 2008). Ein weiterer Maturationshemmstoff ist UK-201844; die pharmakologischen Eigenschaften werden in Studien geprüft (Blair 2007).

1.3.5. Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)

Ziel einer jeden antiretroviralen Therapie ist, das Fortschreiten der Infektion so lange wie möglich hinauszuzögern. Dazu gehört u.a. eine Senkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze, also 20-50 zirkulierenden Kopien pro ml Blut. Schemata zur antiretroviralen Therapie werden von den Fachgesellschaften regelmässig veröffentlicht und aktualisiert (Yeni 2002, Hammer 2006).

Mit Einführung der Proteaseinhibitoren 1995 und in den Folgejahren der NNRTI etablierte sich schnell eine Kombinationstherapie, bestehend aus 2 bis 3 verfügbaren Medikamenten, die auch als **hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)** bezeichnet wird. Der optimale Zeitpunkt für einen Therapiebeginn wird fortwährend diskutiert und ein früher Medikamenteneinsatz gegen einen späten abgewogen. Die Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) empfiehlt, bei HIV-assoziierten Manifestationen mit der Behandlung zu beginnen, da die Symptome positiv beeinflusst werden und die Erkrankung langsamer fortschreitet (Deutsche AIDS-Gesellschaft [DAIG], 2008). Als Initialbehandlung wird analog den amerikanischen Richtlinien entweder zu einem Proteaseinhibitor oder einem NNRTI in Kombination mit zwei NRTI geraten (AIDSinfo, "Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1 Infected Adults and Adolescents, January 29, 2008"). Eine „Boosterung“ des verwendeten Proteaseinhibitors (PI) mit einer niedrigen Dosis Ritonavir erhöht

meist die Wirksamkeit und vermindert die Resistenzentwicklungsrate.

Die Indikation für eine sog. "**Rettungs**"- (engl. **salvage**) Therapie wird uneinheitlich gestellt. Letztlich handelt es sich um verschiedene Behandlungstrategien bei Therapieversagen, sei es bei Fehlschlägen im zweiten Therapieversuch, bei mangelnder Wirksamkeit aller Substanzklassen oder auch beim Auftreten multipler Resistzenzen gegen mindestens zwei der drei gängigen Wirkstoffklassen. Integrasehemmer, Korezeptorantagonisten, Attachment- und Virusreifungsinhibitoren geben auch hier Grund zur Hoffnung.

1.4. Mutationen und Resistenzentwicklung

Seit im Rahmen der HAART eine Kombinationstherapie antiretroviraler Medikamente aus verschiedenen Substanzklassen möglich ist, hat sich die durchschnittliche Überlebensrate der infizierten Patienten signifikant verbessert (Pallela 1998). Allerdings besteht durch natürlich auftretende, aber auch durch im Rahmen der Therapie entstandene Mutationen eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der Viren auf manche Wirkstoffe.

1.4.1. Mutationen

Die Entstehung von Mutationen ist stark mit der Virusreplikation gekoppelt. Einerseits entstehen durch einen von Natur aus hohen Produktionsumsatz täglich etwa 10 Milliarden Viruspartikel neu, so dass trotz einer vergleichsweise kurzen Überlebenszeit infizierter Zellen ein Gleichgewicht zwischen ihrer Elimination und einer Neuinfektion besteht. Zum anderen weist die reverse Transkriptase eine hohe Fehlerrate auf, da ihr u.a. die Fähigkeit zum gleichzeitigen Korrekturlesen fehlt (Perelson 1996, Roberts 1988). Durch Anhäufung proviraler Varianten und Vermischung des genetischen Materials verschiedener Virusarten kommt es zu einer großen genetischen Variabilität. Neben infektiösen, funktionsfähigen Viren und Virusvarianten entstehen solche, die zu einer Vermehrung nicht mehr in der Lage sind. Schon wenige Monate nach Primärinfektion haben sich unzählige verschiedene Virusarten gebildet, die sog. **Quasi-Spezies**. Einzelne Varianten können angesichts des durch medikamentöse Therapie und Immunantwort des menschlichen Organismus ausgeübten Selektionsdrucks einen Vorteil besitzen und zur vorherrschenden Spezies selektioniert werden (Clavel 2004, Drake 1993/1999).

In verschiedenen Studien wurde eine hohe **Prävalenz** primärer Resistenzmutationen festgestellt. In Europa fanden sich im Rahmen der CATCH-Studie zwischen 1996 und 2002 bei etwa 10% der Neuinfektionen Mutationen (Wensing 2005), in US-amerikanischen Studien wurden sogar Raten um 14% bei vorher unbehandelten Patienten bzw. neu diagnostizierter Patienten beschrieben (Ross

2004, Truong 2006). Das Robert-Koch-Institut wies im Zeitraum 1996 bis 2005 unter Studienteilnehmern einen Anteil von 14% primär resistenten HI-Viren nach (Bartmeyer, www.rki.de). Regionen, in denen eine stärkere Durchmischung der Bevölkerung stattfindet und guter Zugang zu antiretroviralen Medikamenten besteht, sind vermehrt betroffen, wie Daten aus amerikanischen Großstädten belegten (Little 2002). Insgesamt ergeben sich für die Prävalenz primärer Resistzenzen Häufigkeiten zwischen 9 und 23 Prozent (Wolf 2008).

Die Weltgesundheitsorganisation definiert als **Resistenz** die Fähigkeit des HI-Virus, in der Gegenwart antiretroviraler Substanzen durch Mutationen seine Gestalt zu verändern und sich zu reproduzieren, so dass die Medikamentenwirkung herabgesetzt ist (vgl. Weltgesundheitsorganisation (WHO), <http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/en/index.html>). Eine **primäre Resistenz** besteht vor Therapiebeginn und bezeichnet im strengen Sinne eine genetisch fixierte Eigenschaft des HI-Virus, die es verhindert empfindlich gegenüber einem Medikament oder einer ganzen Substanzklasse macht. Eine sekundäre Resistenz entsteht hingegen im Rahmen der medikamentösen Therapie.

Einige Virus-Typen oder -Subtypen sind von Natur aus wenig oder nicht empfänglich gegenüber antiretroviralen Substanzen, beispielsweise HIV-2 gegenüber den meisten nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Shafer 1997, Palmer 1998, Descamps 1998, Witvrouw 1999).

1.4.2. Resistenzmechanismen und Substanz-spezifische Mutationen

Neben primären Resistzenzen bewirkt eine antiretrovirale Therapie durch verschiedenartige, oft für eine Medikamentenklasse spezifische Mechanismen eine Selektionierung resistenter Subspezies. Zur **Resistenz gegenüber nukleotidischen oder nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren** tragen zwei Hauptmechanismen bei. Die sog. **sterische Inhibition** betrifft meist das aktive Zentrum des Enzyms und beeinträchtigt den Einbau falscher Bausteine, also den zentralen Wirkmechanismus der NRTI. Daneben kann eine Gruppe von Mutationen, die so genannten Thymidin-Analoga-Mutationen ("TAM"), mittels **Phosphorolyse** zur Entfernung der Nukleosidanaloge aus der terminierten DNS-Kette führen. Sie wurden zuerst nach Gabe der Thymidin-Analoga Zidovudin und Stavudin beobachtet, können aber gleichzeitig zur Resistenz gegen beinahe alle Nukleosidanaloge führen, so dass häufig auch der Begriff "**Nukleosidanalog-Mutationen**" ("NAM") verwendet wird. Dazu gehören u.a. M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y und K219Q (Clavel 2004).

Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren haben normalerweise eine starke Affinität zu einer hydrophoben "Tasche" in der Nähe des katalytischen Zentrums der RT. Die NNRTI beeinträchtigen die sterische Flexibilität des Enzyms und blockieren damit die DNS-Synthese. Durch Mutationen im Bereich dieser Tasche ist die Medikamentenbindung stark vermindert.

Resistenzmutationen gegenüber **Protease-Inhibitoren** kann man grob in Haupt- ("major mutations") und Neben- ("minor mutations") Mutationen einteilen. Unter **Hauptmutationen** versteht man chronologisch zuerst auftretende oder das aktive Zentrum ("substrate cleft") betreffende Mutationen. „Substrate cleft“- Mutationen vermindern durch Austausch von Aminosäuren im katalytischen Bereich die Bindungsaffinität zwischen PI und aktivem Zentrum.

Nebenmutationen sind meist später entstanden oder an anderen Positionen lokalisiert wie den Enzymklappen (Stanford University HIV Drug Resistance Database, „Sequence Analysis Program, Version 4.2.5.“). „Flap mutations“, also Strukturänderungen der Protease-Klappen und v.a. der Klappenspitzen beeinträchtigen die Flexibilität, die nötig ist, um Ein- und Austritt der Substrate zu regulieren. Somit wird den PI der Zugang zum aktiven Zentrum und damit ihrer Bindungsstelle verwehrt. Oft sind zusätzlich zu „substrate cleft“- und „flap“- auch an anderen Orten lokalisierte Mutationen nötig, damit die Resistenz manifest wird. Dies wurde mancherorts als genetische Barriere der Medikamentenresistenz bezeichnet (Shafer, „Genotypic testing for HIV-1 Drug Resistance (2003)“).

1.4.3. Virale Fitness

Mutationen können sich unterschiedlich auf die virale Replikationskapazität auswirken. Unter dem darwinistischen Druck der antiretroviroalen Therapie entstandene seltene Mutationen einer Virus-Subpopulation können zwar einen selektiven Vorteil darstellen, oft bewirken sie aber neben einer Medikamentenresistenz auch eine verminderte Replikationsfähigkeit und damit reduzierte virale Fitness. Diese beschreibt im Wesentlichen die Fähigkeit des Virus, sich in die menschlichen Zielzellen effektiv einzuschleusen und das Virusgenom zu verbreiten. Eine verminderte Fitness liegt meist dann vor, wenn Schlüsselpositionen essentieller Virusproteine betroffen sind. Manche so entstandenen Funktionsausfälle der viralen Enzyme können zwar durch kompensatorische Mutationen teilweise ausgeglichen werden, dennoch ist die Replikationskapazität meist grundlegend vermindert (Bleiber 2001; Deeks 2001; Turner 2004). Andernorts wurde als wesentlicher Faktor für die virale Fitness die "robustness" (engl. für „Zähigkeit“) und damit die Fähigkeit eines Proteins

beschrieben, Substitutionen im Genom zu tolerieren (Parera 1996).

1.5. Resistenztestung

Mutationen, die zu Strukturänderungen von Zielproteinen antiretroviraler Substanzen und damit zur Resistenz führen, lassen sich entsprechend im Virus-Genom nachweisen. Allgemein existieren zwei Methoden zur Bestimmung von Resistenzmutationen:

Bei der **phänotypischen Resistenztestung** wird die Empfindlichkeit des Virus gegenüber verschiedenen Pharmaka direkt ausgetestet, indem man unter Medikamenteneinwirkung die Replikationsfähigkeit in einer Zellkultur bestimmt und diese mit der Fitness des Wildtyps vergleicht. Bei **genotypischen Resistenztests** werden Mutationen analysiert, die mit Resistzenzen assoziiert werden. Die erhobenen Daten werden mit Hilfe von Algorithmen interpretiert, die auf klinischen Beobachtungen, in-vitro-Studien sowie Vergleichsstudien zwischen Genotyp und phänotypischer Resistenz basieren, so dass ein virtueller Phänotyp erstellt werden kann.

Empfohlen wird die Durchführung eines Resistenztests u.a. vor Beginn einer antiretroviralen Ersttherapie, bei Therapieversagen oder im Falle einer Schwangerschaft (AIDSinfo 2008; Deutsche AIDS-Gesellschaft, "Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretrovralen Therapie der HIV-Infektion (Stand September 2008").

1.6. Virus-Subtypen und Resistenzentwicklung

Es existieren allgemein zwei verschiedene HIV-Typen und mehrere Subtypen. Weltweit am häufigsten kommt HIV-Typ 1 vor, der sich wiederum in drei unterschiedliche Hauptgruppen unterteilen lässt. In über 99% der Fälle liegt – als die größte Gruppe - M ("major") vor; die selteneren Gruppen O ("outlying") und N ("new") lassen sich hauptsächlich in Afrika nachweisen. Die Gruppe M besteht wiederum aus verschiedenen Subtypen (A-D, F-H, J, K) und Mischformen. Der HIV-1-Subtyp B kam in Amerika, Europa, Japan und Australien lange Zeit am häufigsten vor. Deshalb ist die Unterteilung in B- und Non-B-Viren vielerorts noch gebräuchlich. Letztere sind jedoch im Zuge der Pandemisierung für immer mehr Neuerkrankungen verantwortlich und machen etwa 25% aller Neuinfektionen in Europa aus. C ist der häufigste Non-B-Subtyp und für ca. 50% aller weltweiten Infektionen verantwortlich. Im Rahmen von Globalisierung und Migration kommt es jedoch vermehrt zur Bildung neuer Mischformen ("circulating recombinant forms", CRF). Die Los-Alamos-Datenbank listet bereits über 40 CRF auf mit stetig wachsender Zahl (Leitner, "HIV-1 Subtype and Circulate Recombinant Form (CRF) Reference Sequences"; Burke 1997; Taylor B.S. 2008; Wainberg 2004). HIV-Typ 2 ist wesentlich seltener und lässt sich in sechs Subtypen (A-F)

unterteilen.

Verschiedene Besonderheiten der einzelnen HIV-Subtypen machen ihre Bedeutung in der antiretroviralen Diagnostik und Therapie deutlich. So basieren die gängigen Resistenzalgorithmen auf Erfahrungen mit Subtyp-B-Viren. Non-B-Viren können aber natürliche Polymorphismen mit unterschiedlichem Einfluss auf die Resistenzentwicklung aufweisen. Gleichzeitig entwickeln Viren verschiedenen Subtyps teilweise unter der gleichen medikamentösen Therapie verschiedene Mutationen.

Beispielsweise bedeutete die Existenz von Y181C bzw. Y181I (RT) bei der HIV-1-Gruppe O und allen HIV-2-Stämmen eine Primärresistenz gegenüber NNRTI, der Subtyp F blieb hingegen weitgehend sensibel gegenüber dieser Substanzklasse. Subtyp-C-Viren wiesen bei Exposition mit Efavirenz die Schlüsselmutation V106M auf, Subtyp-B-Viren nicht. In verschiedenen Studien wurde bei Subtyp-C-Isolaten eine deutlich frühere Resistenzentwicklung gegenüber NNRTI beschrieben als bei Subtyp B-Isolaten (Loemba 2002; Snoeck 2006; Wainberg 2004).

Diese genetische Diversität der HIV-Stämme geht mit einer deutlich unterschiedlichen Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber antiretroviralen Substanzen einher, was von großer Bedeutung für die Therapie der Infektionskrankheit ist. Analysen des Virus-Subtyps werden daher für die Abschätzung der Effektivität und die Neuentwicklung antiretroviraler Wirkstoffe in der Zukunft eine große Rolle spielen (Taylor B.S. 2008).

1.7. Resistenztestung im Max von Pettenkofer-Institut

Die weltweit größte HIV-Referenzdatenbank ist die Los Alamos Datenbank, die Ende 2007 etwa 229451 Sequenzen enthielt (Kuiken 2008). Im Vergleich dazu verzeichnete im März 2009 die "HIV Drug Resistance Database" der Stanford University etwa 106660 Sequenzen und 43790 Individuen (Shafer, "Summary Statistics", Stand 02.03.2009). Beide Datenbanken speisen sich aus Einträgen verschiedenster Institutionen aus unterschiedlichen Ländern. Viele Studien zu Resistenzentwicklung und Mutationen des HI-Virus beziehen sich auf die Datenbanken von Los Alamos oder Stanford University, verwenden aber auch eigene Datenbanken. So wies eine HIV-Datenbank der Universität Siena im Jahr 2002 etwa 1930 Patienten auf; Wildtyp-Sequenzen als Kontrollgruppe wurden von der Stanford HIV Drug Resistance Database bezogen. Das kanadische British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS in Vancouver umfasste im gleichen Jahr knapp 4300 RT-Sequenzen von über 1600 Patienten (Romano 2002; Saracino 2006).

Im **Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie (MvP)** werden seit 1996 genotypische HIV-Resistenztests durchgeführt. Die eingegangenen Patientenproben stammen zum

Großteil aus einzelnen Kliniken des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Haupteinsender sind die Medizinischen Kliniken und Polikliniken, die Kliniken für Gynäkologie und Dermatologie der LMU sowie das Klinikum der Technischen Universität München und das Städtische Krankenhaus München-Schwabing. Die getesteten Patienten stammen überwiegend aus dem gesamten Großraum München. Allein von 2000 bis Mitte des Jahres 2004 wurden etwa 1300 Patienten-Proben sequenziert und genotypisch auf mögliche Medikamentenresistenzen getestet. Bedenkt man, dass in Bayern bis Ende des Jahres 2004 etwa 3200 HIV-Erstdiagnosen gestellt wurden – 2008 wurde über 9500 HIV-infizierte Personen berichtet - liegt dem MvP eine vergleichsweise große Menge an Virussequenzen vor. Bezuglich der Patientenzahl weist die MvP-Datenbank eine ähnliche Größe bei gleichwohl geringerer Anzahl enthaltener Sequenzen auf wie die Datenbanken aus Siena und Vancouver.

2. Zielsetzung

Die vergleichsweise große und repräsentative Anzahl an Resistenz-getesteten HIV-Sequenzen weckte den Wunsch, die gewonnenen Informationen in einer Datenbank zusammenzufassen, um sie weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen. Bis dahin wurden die Virusenzyme Reverse Transkriptase und Protease sequenziert und dann eine genotypische Resistenz-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Probennummer versehen und gespeichert, während das sequenzierte Virusgenom jahrgangsweise auf externen Datenträgern gesichert wurde. Bei dieser herkömmlichen Verfahrensweise waren Zugriffe auf die HIV-Sequenzierungs-Daten oft umständlich.

Ziel dieser Dissertation war es daher, eine HIV-Sequenz-Datenbank im MvP aufzubauen, die Zugriffe auf die vorhandenen RT- und Protease-Sequenzen über das interne wissenschaftliche Netzwerk erlaubte, den vollen Informationsgehalt der vorhandenen Proben gewährleistete und unterschiedliche Analysen der enthaltenen Daten ermöglichte. Hierzu gehörten u.a. die Häufigkeit einzelner Mutationen, Mutationswege sowie Kombinationen von Mutationen unter dem Einfluss antiretroviraler Substanzen.

3. Material und Methoden

3.1. Ausgangsdaten

Zum Aufbau der Datenbank wurden Sequenzen ab **Januar 2000 bis zum Oktober 2004** verwendet, um so einen großen Informationsgehalt zu erzielen und gleichzeitig die neuen Möglichkeiten mit einem limitierten Umfang austesten zu können. Über diese Dissertation hinaus soll jedoch das

langfristige Ziel sein, alle Resistenzdaten, die seit Beginn der Testungen im Jahr 1996 im MvP ermittelt wurden, auch in die Datenbank aufzunehmen.

Insgesamt wurden im angegebenen Zeitraum 1326 Reverse-Transkriptase- (RT-) und 1286 Protease- (PR-) Sequenzen erfasst. Im Jahr 2000 waren es 468 (RT) bzw. 438 (PR), 2001 267 (RT) bzw. 265 (PR), 2002 270 bzw. 260, 2003 217 bzw. 219 und im Jahr 2004 bis Ende Oktober 104 Sequenzen. Davon konnten im Fall der RT nur 1259 und der Protease 1245 Sequenzen verwendet werden, da in einigen Fällen Qualität oder Länge für eine weitere Bearbeitung nicht ausreichten.

Im gewählten Zeitraum wurden 817 (RT) bzw. 801 (PR) verschiedene Patienten getestet und in die Datenbank aufgenommen. Die **Patientendaten** waren im wissenschaftlichen Netz des MvP verfügbar und enthielten Namen, Vornamen und Geburtsdatum sowie Information über das einsendende Institut. Daneben fand sich ein Verweis auf die vom MvP zugewiesene Probennummer. Aus Gründen der Anonymität wurden in der MvP-Datenbank Informationen, die auf die Identität des Patienten schließen ließen, verschlüsselt.

3.2. Sequenzierung der Patientenproben und Weiterverarbeitung

Für die Erzeugung der Datenbank wurde auf bereits vorhandene Sequenzdaten zurückgegriffen, die im Rahmen des normalen Resistenztestungsbetriebs entstanden.

Aus den mit Hilfe der Fluoreszenz-Sequenzierung nach Sanger gewonnenen DNS-Strängen (Sanger 1977) wurden **Elektropherogramme** generiert. Den Elektropherogramm-"peaks" wurden die entsprechenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin zugeordnet, so dass Basenabfolgen entstanden. Im normalen Testbetrieb des MvP wurde ein Alignment an die international verbreitete Referenzsequenz des Wildtyp-Virusisolats "HXB2" durchgeführt (Leitner, "Sequence Database - Tools - LOCATE - HIV Sequence locator tool"). Programme wie ADRA ("Antiviral Drug Resistance Analysis") der Los Alamos Drug Resistance Database, das "HIVdb Sequence Analysis Program" der Universität Stanford oder das deutsche Programm "geno2pheno" ermöglichten dann die gewünschten Resistenzanalysen (Leitner, "Sequence Database - Tools - ADRA - ADRA: Antiviral Drug Resistance Analysis"; Shafer, "HIVdb Program: Sequence Analysis"; Altmann, "geno2pheno").

Allen Sequenzdaten wurde zur späteren Identifikation die "**"MvP_ID"**" als achtstellige Probennummer des Max von Pettenkofer-Instituts zugewiesen. An der ersten Position steht in den Jahren 2000 bis 2003 "A", ab dem Jahr 2004 "V". Gefolgt wird der Anfangsbuchstabe von der

zweistelligen Jahreszahl, beispielsweise "00" für das Jahr 2000. Dann folgt eine chronologisch vergebene fünfstellige Nummer. Eine Sequenz vom Beginn des Jahres 2001 könnte daher "A0103523" lauten, eine vom Ende des Jahres 2004 "V0423167".

Die Speicherung der Daten erfolgte in einem FASTA-ähnlichen Format innerhalb der ABI-Prism-Software. Das FASTA-Format ist ein textbasiertes **Datenspeicherungsformat** zur Darstellung der Primärstruktur von Nukleinsäuren und Proteinen. Die Daten beginnen in der 1. Zeile mit einem „>“-Zeichen, gefolgt vom Namen. In den nächsten Zeilen folgt die betreffende Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz, codiert als Abfolge einzelner Buchstaben, mit 60 Zeichen pro Zeile. Die Codierung der Sequenzen erfolgt mit Hilfe des international gültigen IUB- bzw. IUPAC-Code (National Center for Biotechnology Information; IUPAC/IUB).

Tabelle 3a-c: IUPAC-Code für Aminosäuren und Nukleinsäuren:

3a) Basen:

IUPAC-Code	Base
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

3b) Degenerierte Basen:

IUPAC-Code	Basen
R	Purine (Adenin oder Guanin)
Y	Pyrimidine (Cytosin oder Thymin/Uracil)
M	Cytosin oder Adenin (Amino-Gruppe sowohl bei Adenin als auch bei Cytosin an analogen Positionen)
K	Thymin/Uracil oder Guanin (Keto-Gruppe an analogen Positionen)
W	Thymin/Uracil oder Adenin ("weak", also schwache Wasserstoffbrückenbindung zwischen A und T)
S	Cytosin oder Guanin ("strong", also starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen C und G)
B	Nicht A (Cytosin, Thymin/Uracil oder Guanin)
D	Nicht C (Adenin, Thymin/Uracil oder Guanin)
H	Nicht G (Adenin, Thymin/Uracil oder Cytosin)
V	Nicht T/U (Adenin, Cytosin oder Guanin)
N	Any (alle möglichen Basen, d.h. Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin/Uracil)

3c) Aminosäuren:

IUPAC-Code (1 Buchstabe)	IUPAC-Code (3 Buchstaben)	Aminosäure
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat
C	Cys	Cystein

Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat
G	Gly	Glycine
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin
B	Asx	Aspartat oder Asparagin
Z	Glx	Glutamat oder Glutamin
X	Xaa	Jede beliebige Aminosäure

3.3. Erstellung einer HIV-Datenbank

Die neu zu erstellende Datenbank sollte einen einfachen Zugang zu den auf externen Speichermedien gesicherten Sequenzierungs-Daten der beiden Virusenzyme Reverse Transkriptase und Protease ermöglichen und einen möglichst großen Informationsgehalt aufweisen, weshalb Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen eingeschlossen wurden. Neben der „MvP_ID“ als Probennummer sollte eine anonymisierte Patientenkennung („Pat_ID“) Rückschluss darüber zulassen, ob Proben vom gleichen oder von verschiedenen Patienten stammten.

Die Tabellen "RT_fastalike" und "Prot_fastalike" enthalten die jeweils etwa 1300 Reverse-Transkriptase- und Protease-Sequenzen im "FASTA-like"-Format. Um einzelne Codons sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene analysieren zu können, umfasst die Datenbank die nach Triplets geordneten Nukleinsäuresequenzen ("rt_triplets" und "prot_triplets") und die translatierten Aminosäuresequenzen ("aa_RT" bzw. "aa_Prot"). Für einen maximalen Informationsgewinn und eine optimale Abrufbarkeit der Daten wurde jeder Position der entsprechenden Sequenz eine eigene Spalte innerhalb der Tabelle zugewiesen. Die Tabellen "Pat_ID_RT" und "Pat_ID_Pro" ermöglichen eine Zuordnung der Probenkennung „MvP_ID“ zur Patientenkennung "Pat_ID".

Die geplante HIV-Resistenzdatenbank machte zuerst einen Import der gewünschten Datensätze in der für spätere Analysen geeigneten Form nötig. Die hauptsächlichen Anforderungen für das

Datenbankformat waren eine gute Zugänglichkeit und Abrufbarkeit, eine möglichst effektive Datenverwaltung und die Option einer späteren Erweiterung, benutzerfreundliche und flexible Programmierbarkeit, Anpassbarkeit an die speziellen Erfordernisse einer HIV-Datenbank sowie die Kompatibilität mit verschiedenen Hilfsprogrammen.

Als Skript-Programmiersprache wurde das Plattform-unabhängige Open-Source-Programm "php" und als Datenbank-Management-System "MySQL" gewählt. Die Datenbank wurde mit dem kombinierten Programm "php MyAdmin" in der Version 2.9.1.1. generiert; es enthält "MySQL" in der Version 4.0 bzw. später 4.0.25 sowie "php" in der Serverversion 5.1. (Stand: August 2007). Für die Anpassung der vorliegenden Daten, den Import des Dateninhaltes in die Datenbank und die Erstellung von Hilfsprogrammen wurde die flexible Programmiersprache "Perl" verwendet.

MySQL ist ein relationales Datenbankverwaltungssystem und gehört zu den gebräuchlichsten Datenbanksystemen. Innerhalb des Systems können mehrere Datenbanken erstellt werden, in denen wiederum Tabellen angelegt werden können, deren Art unterschiedlich sein kann und nur vom gebrauchten Betriebssystem limitiert wird. MySQL bietet eine einfache Anpassung an die speziellen Bedürfnisse der jeweiligen Datenbank, ist an jedes Betriebssystem anpassbar und ermöglicht eine optimale Koordination der spezifischen Datenabfragen. Die verteilte Transaktionsfähigkeit verhindert eine Blockade bei gleichzeitigem Zugriff. Befehle werden zwar lokal in der Abfragesprache MySQL, im sog. "Client", eingegeben. Vom Datenbankserver können dann aber ganze Abfolgen von Befehlen ausgeführt werden, so dass der Informationsaustausch zwischen Client und Server optimiert ist (Wikipedia, "MySQL"; MySQL AB Firmenhomepage; Taylor A.G. 2001; Reese 2003).

Php ist eine Skriptsprache zur Erstellung flexibler Internetanwendungen. Sie wird server-seitig interpretiert, d.h. die Informationen werden zunächst an einen sog. Interpreter auf dem Webserver gesendet, der sie verarbeitet und dann erst an den "Client", den Webbrowser, schickt. So sind nur die generierten Daten für den Betrachter einsehbar. Die HIV-Datenbank benötigt daher keine direkte Verbindung zum Client. Nachteil ist, dass jede neue Aktion einzeln erfasst werden muss und der Interpreter den Quelltext bei jedem Aufruf neu überprüft und übersetzt. Die Vorteile von Php neben seiner offenen Zugänglichkeit als "OpenSource"-Programm sind aber sicherlich das einfache Sammeln von Formulardaten sowie die dynamische Generierung von Webinhalten, so dass eine optimale Kompatibilität mit SQL ermöglicht wird. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die breite

Unterstützung aller gängigen Betriebssysteme, der meisten Webserver und Datenbankformate und besonders die hervorragende Kompatibilität mit MySQL. Im vorliegenden Falle ist damit eine einheitliche Verwaltung der Datenbank gewährleistet, gerade, da im MvP verschiedene Betriebssysteme mit unterschiedlich zueinander kompatiblen Programmen aufeinander abgestimmt werden müssen. Zudem ist es aufgrund der umfangreichen Textverarbeitungsmöglichkeiten optimal geeignet, um die IUPAC- bzw. IUB-codierten Nuklein- und Aminosäuresequenzen zu verwalten und diesbezüglich Daten zu importieren und exportieren (Wikipedia, "PHP"; Php-Firmenhomepage).

PhpMyAdmin ist eine frei verfügbare Anwendung zur Verwaltung von MySQL-Datenbanken. Die Administration erfolgt mit einem Webbrowser und ermöglicht eine Datenbankverwaltung auch auf fremden Rechnern innerhalb eines Netzwerkes oder über das Internet. Derzeit kann es Datenbanken, Tabellen und Inhaltsfelder kreieren und bearbeiten, alle SQL-Befehle ausführen sowie Daten in vielen Formaten exportieren (Wikipedia, "PHPMyAdmin"). Die HIV-Sequenzdatenbank des MvP kann daher berechtigten Nutzern von intern und extern Zugriff bieten.

Aufgrund der großen Menge an Sequenzen, die in die neue Datenbank aufgenommen werden sollten, und der Verwendung unterschiedlicher Betriebssysteme und Datenformate erschien die Verwendung von **Hilfsprogrammen** als sinnvolle Lösung, um den Arbeitsprozess zu erleichtern. Diese sollten das Einspeisen der Sequenzen in die Datenbank erleichtern, einen Zugriff auf die vorhandenen Sequenzen und deren Bearbeitung ermöglichen und aus den so gewonnenen Daten eine Tabelle kreieren können. Unabdingbar war eine Kompatibilität mit "phpMyAdmin" und verschiedenen anderen Programmen. Zu diesem Zweck wurde "**Perl**" verwendet, eine flexible, intuitive Programmiersprache, die für praktische, problemorientierte Anwendungen entwickelt wurde. Sie zeichnet sich durch eine schnelle und einfache Programmierbarkeit, ein breites Angebot verschiedener Formulierungen und Lösungswege für ein Problem sowie die Möglichkeit, objektorientierte und funktionelle Befehle zu kombinieren, aus. Merkmale komplexerer Textstrukturen, z.B. ein Vergleich von Ähnlichkeiten oder Unterschieden der enthaltenen Zeichen, können mit Perl leicht untersucht werden. Insbesondere die Möglichkeiten, Daten in Textform zu verarbeiten, sowie die Möglichkeit zu einer Verknüpfung unterschiedlicher Systemstandards waren bei der Erstellung der HIV-Datenbank hilfreich. (Wikipedia, "Perl"; Wall, 2001; Hoffmann P.E., 2002).

Somit waren die Voraussetzungen für eine einfach zugängliche Plattform gegeben, die die im MvP vorhandenen Betriebssysteme und Datenformate unterstützte, optimale Datenverwaltung und

-sicherheit ermöglichte und mit ihrer Flexibilität verschiedene Datenanalysen unterstützte.

3.4. Import der Sequenzierungsdaten in die Datenbank

Die große Anzahl an Patientenproben war zwar in Hinblick auf die Repräsentativität der Datenbank von Vorteil, machte ihre Erstellung aber auch sehr zeitaufwendig. Die vorhandenen Sequenzen aus den Jahren 2000 bis 2003 waren auf externen Medien, diejenigen aus dem Jahr 2004 auf einem Macintosh-Rechner gespeichert und dementsprechend nur mit der Macintosh-kompatiblen ABI-Prism-Software abrufbar. Um die Sequenzen mit anderen Programmen bearbeiten zu können, mussten sie demnach in ein allgemein lesbares Format gebracht werden.

Da die Dateiformate von Macintosh, Word und Linux nur ungenügend kompatibel sind, bedarf es zum **Datentransfer** eines Formats, das die Buchstabenabfolgen der Sequenzierungsdaten für alle Betriebssysteme lesbar macht. Diese Voraussetzung erfüllt das Txt-Format, ein auf ASCII basierendes Standard-Textformat. Eine Darstellung ist durch das Macintosh-Programm "Simple Text" und auf dem PC durch "Wordpad" möglich.

Die Nukleinsäuresequenzen aus dem Jahr 2004 konnten direkt vom Macintosh-Rechner abgerufen werden. Die Sequenzen aus anderen Jahren wurden neu auf eine Macintosh-Benutzeroberfläche geladen und mit der ABI-Prism-Software geöffnet. Jede Datei wurde manuell geöffnet, dann - in voneinander getrennten Schritten für die beiden Enzyme - die Nukleinsäuresequenz markiert und schließlich zusammen mit der „MvP_ID“ in eine einfache Textdatei kopiert. In dieser Form war der Zugriff über ein Linux- und Windows-Betriebssystem möglich.

Zu Beginn der Resistenztestungen wurden im Institut für die reverse Transkriptase drei, später dann zwei Unterabschnitte des Enzyms als Strang und Gegenstrang sequenziert. Um eine möglichst eindeutig definierte Nukleinsäuresequenz zu erstellen, mussten die Stränge zu einem Gesamtstrang aneinandergefügt werden und dieser dann manuell extrahiert werden. Dies wurde durch die teilweise sehr unterschiedliche Qualität der sequenzierten Stränge erschwert. Einige unvollständige oder qualitativ minderwertige Sequenzen wurden deshalb nicht in die Datenbank aufgenommen.

Die verwertbaren Sequenzen lagen nun mit „MvP_ID“ und Zeichenfolge in einem FASTA-ähnlichen Format vor. Mit Hilfe der Intranet-Formulare der Perl-Übertragungsprogramme "rt.pl" bzw. „prot.pl“ wurden die Daten in die dafür vorgesehenen Tabellen „**RT_fastalike**“ und „**Prot_fastalike**“ eingespeist (Obermeier, "Einleseformular für Nukleinsäuresequenzen"), die entsprechend die "MvP_ID", ein Textfeld mit der Nukleinsäureabfolge und schließlich fakultativ Patientenkennung „Pat_ID“ und Datum enthalten. Als Grundlage der HIV-Datenbank im MvP

ermöglichten beide Tabellen erstmals eine gezielte Abfrage bestimmter Mutationen. Limitierend war jedoch die Darstellung der DNS-Sequenz als fortlaufende Buchstabenabfolge. Um die Sequenzen in eine übersichtliche und einfach zu analysierende Form zu bringen und parallel Zugriff auf die Aminosäurenabfolgen der beiden Virusenzyme zu haben, war es nötig, eine Translation der im "fastalike"-Format gespeicherten Daten durchzuführen.

3.5. Umgang mit Patientendaten

Durch Integration einer Patientenkennung in die Datenbank sollten mehrere Proben eines Patienten als zusammengehörig erkennbar sein, Informationen über zeitliche Abfolgen von Mutationen innerhalb eines HIV-Infizierten gewonnen und damit umfassendere Fragestellungen bezüglich des individuellen Resistenzstatus geklärt werden können. Da ein möglichst einfacher Zugang zur HIV-Datenbank auch von fremden Rechnern mit entsprechender Berechtigung gewährleistet sein sollte, musste die Patientenidentität aus Gründen des **Datenschutzes** verschlüsselt werden. Zu diesem Zweck wurde das **Verschlüsselungsprogramm "Pat-IDX"** in "Perl" programmiert. Die im Rahmen des regulären Diagnostik-Betriebs erhobenen Patientendaten wurden manuell eingegeben, mit Hilfe des Kodierungsalgorithmus in einem 10-stelligen Code verschlüsselt und als Patientenkennung „Pat_ID“ wiedergegeben. Diese enthält Bestandteile von Geburtsdatum, Vor- und Nachnamen und zusätzliche Ziffern, eine ähnliche Kodierung, wie sie auch vom Robert-Koch-Institut in Berlin verwendet wird. „MvP_ID“ und dazugehörige „Pat_ID“ wurden in zwei neue Tabellen, „**Pat_ID_RT**“ und „**Pat_ID_Pro**“, integriert, welche eine nach Patienten getrennte Auswertung möglich machten.

3.6. Weiterverarbeitung der Sequenzierungsdaten

Da später auch Übergänge zwischen Mutationen und das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Quasi-Spezies erfasst werden sollten, musste auf **gängige Translationsprogramme** verzichtet werden, deren Nachteil in einem Informationsverlust bei der Übersetzung mehrdeutiger, sog. degenerierter Basen lag. Hieraus ergeben sich mehrere theoretische Möglichkeiten, sie in Aminosäuren zu übersetzen. Die Translationsprogramme der Los Alamos Datenbank und des Europäischen Bioinformatischen Instituts (Leitner, "Sequence Database - Tools - Translate"; European Bioinformatics Institute (EBI), "EMBOSS transeq") setzten beispielsweise bei Mehrdeutigkeit eines Codons einen Platzhalter ein und ignorierten ihn bei der Weiterverarbeitung der Sequenz. Programme wie das Sequence Analysis Programm der Stanford HIV-Database hingegen berücksichtigten Codons mit degenerierten Basen, ließen aber durch ihr spezielles Format

keinen weiteren Export dieser Daten zu (Shafer, "HIVseq Program: Sequence Analysis).

3.6.1. Degenerierte Basen

Degenerierte Basen in den Elektropherogrammen entstehen dann, wenn das zugrunde liegende Elektropherogramm keine klar definierte Spitze (englisch "peak") anzeigt oder mehr als ein Ausschlag vorhanden ist. Ein Elektropherogramm besteht einerseits aus der Fluoreszenzintensität in der Ordinate und der Gel-Laufstrecke, d.h. der Nukleinsäureposition, in der Abszisse. Abstand und Höhe der Elektropherogramm-Spitzen (englisch „peaks“) sowie An- und Abstieg und Breite des Fluoreszenzintervalls ergeben einen sog. Konfidenzwert. Bei der Interpretation des Elektropherogramms wird die jeweilige Base durch den höchsten Konfidenzwert an ihrer Position definiert. Liegt der Peak innerhalb eines Konfidenzintervalls, kann man ihm normalerweise exakt eine eindeutige Nukleinsäure zuordnen. Ansonsten ist er mehrdeutig (**Bild 4**), so dass alternative Interpretationsmöglichkeiten existieren. Die Entscheidung für eine der vorliegenden Möglichkeiten würde die andere Option verwerfen und gleichzeitig einen Informationsverlust darstellen.

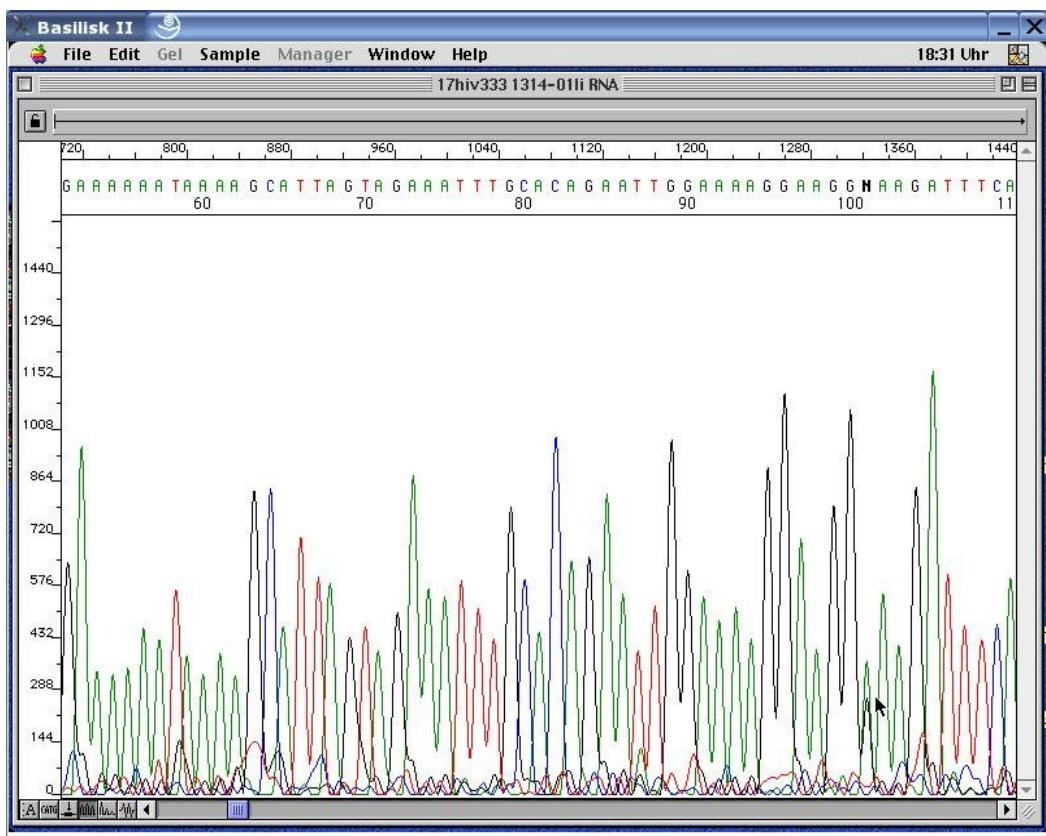


Bild 4) Elektropherogramm: Pfeilspitze markiert eine mehrdeutige Position. Das Analyseprogramm markiert die Nukleinsäure-Position mit dem Zeichen "N" (obere Bildleiste).

3.6.2. Informationserhalt durch IUPAC-Code

Um solche Informationen dennoch weitestgehend zu erhalten, entwickelte die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) bzw. die International Union of Biochemistry IUB den **IUPAC- (bzw. IUB-) Code**, der sich für Nuklein- und Aminosäuren anwenden lässt. Der Code legt eindeutig fest, wie viele und welche Möglichkeiten für eine degenerierte Base in Frage kommen. Da sich hierdurch unzählige Permutationen ergeben können, ist die IUPAC-Codierung sicherlich nicht für die alltägliche Resistenzdiagnostik geeignet. In der MvP-Datenbank war jedoch beabsichtigt, auf alle vorhandenen Informationen zugreifen und deshalb für degenerierte Basen alle denkbaren Alternativen erfassen zu können. Im Idealfall sollte sich deren Zahl dann später durch die natürliche Redundanz des genetischen Codes – verschiedene Basentriplets können die gleiche Aminosäure codieren – und durch Eliminierung von Stopp-Codons reduzieren lassen. Ein Vergleich mit anderen Sequenzen innerhalb der Datenbank konnte helfen, die Plausibilität einiger Permutationen einzuschätzen.

3.6.3. Bewahren eines maximalen Informationsgehalts

Ein eigenes, neu programmiertes Translations-Programm sollte dabei helfen, auch degenerierte Basen bei der Translation zu berücksichtigen. Zur **Fehlerkorrektur** wurden zunächst mit Hilfe eines neu entwickelten Perl-Programms die vorhandenen Basen-Sequenzen auf Fehler überprüft: Sequenzen, denen essenzielle Motive wie die der aktiven Zentren von RT bzw. PR fehlten oder die ein Stopp-Codon enthielten, wurden nochmals neu in die Tabelle eingelesen und erneut kontrolliert. Waren sie immer noch fehlerhaft, so wurden sie aus der Datenbank entfernt. Von 26 betroffenen PR-Sequenzen konnten 20 korrigiert werden, sechs wurden gelöscht. Zehn RT-Sequenzen wurden aus der Datenbank entfernt.

Die so erhaltenen Nukleinsäure-Sequenzen konnten allerdings weiterhin unterschiedliche Startpunkte oder technisch bedingte Lücken in ihrem Strang aufweisen, was bei der Translation zu einer für weitere Analyse fatalen Verschiebung des Leserasters und einer erhöhten Fehlerrate geführt hätte. Durch Anpassung der Basenabfolgen an eine Referenzsequenz, ein sog. Alignment, sollten solche potentiellen Fehlerquellen eliminiert werden. Hierzu wurde mit Hilfe des Skripts "seqret" des Programmpakets EMBOSS (EBI, "EMBOSS seqret") zunächst das FASTA-like-Format, also der durchlaufende Text ohne Zeichenbegrenzung für jede Zeile, in das FASTA-Format mit Zeichenbegrenzung umgewandelt. Die Sequenzen wurden dann mittels des Translationsprogramms "Transseq" (EBI, "EMBOSS transseq") in Aminosäuren übersetzt unter Erstellung mehrerer sog. Frames, von denen wiederum der jeweils beste ("right frame") ausgewählt wurde. Allerdings

wurden nicht eindeutig definierte Positionen mit dem Platzhalter „x“ versehen. Damit wurden die Sequenzen nun auf Aminosäure-Ebene mit Hilfe des EMBOSS-Programms „needle“ an die entsprechende Referenzsequenz des hxb2-Subtyp-B-Virus angeglichen (EBI, "EMBOSS align needle"). Dies entspricht einem sog. **globalen Alignment nach Needleman-Wunsch** (Wikipedia, "Sequenzalignment").

Die entstandenen Aminosäure-Sequenzen waren zwar auf Fehler überprüft und in ihrem Leseraster weitestgehend angeglichen. Dennoch waren die Informationen über mehrdeutige Codons durch Platzhalter deutlich limitiert. Deshalb erfolgte eine **Rückübersetzung** in alignierte Nukleinsäuren, die im Rahmen der IUPAC-Codierung noch alle Informationen enthielten. Die Tabellen „rt_fastalike“ und „prot_fastalike“ wurden entsprechend aktualisiert. Von ihnen ausgehend konnten jetzt im richtigen Raster alle weiteren Schritte unternommen werden, um unter vollem Informationserhalt eine Translation durchzuführen.

Als nächster Schritt wurde die als zusammenhängende Zeichenabfolge gespeicherte Nukleinsäure-Sequenz mit Hilfe eines Perl-Programms in Basentriplets unterteilt. In den zwei neuen Tabellen "rt_triplett" und "prot_triplett" wurde jedem Codon eine eigene Spalte zugeordnet und an manchen Positionen auch Platz für Insertionen gelassen. Dies betraf die PR-Positionen 21, 34, 35, 40, 91, 94 und die RT-Positionen 67 bis 69. „rt_triplett“ enthielt 1249, „prot_triplett“ 1239 Sequenzen. Die Tabellen ermöglichten bereits einfache Mutationsabfragen.

Das im Rahmen dieser Dissertation neu in Perl entwickelte **Translationsprogramm "dna2aa"** übernahm nun die Translation der Basentriplets. Das Programm wandte einen speziellen Translationsalgorithmus auf die enthaltenen Sequenzen an, welcher bei Auftreten degenerierter Basen alle im Sinne des IUPAC-Codes möglichen Kombinationsmöglichkeiten berücksichtigte. Für jede denkbare Permutation auf Nukleinsäure-Ebene wurden die sich daraus ergebenden Basentriplets dargestellt und in die ihnen entsprechende Aminosäure übersetzt. Entsprechend der Informationsredundanz der DNS konnte es dabei vorkommen, dass sich aus zwei oder mehr verschiedenen Codons eine einzige Aminosäure ergab; im Idealfall war nun im Idealfall eine ursprünglich mehrdeutige Position nach Translation eindeutig definiert. Als Beispiel sei eine beliebige, nach IUPAC-Kriterien codierte Nukleinsäure-Sequenz genannt, die an verschiedenen Positionen die Triplets „**TWG**“, „**MGA**“ und „**YTA**“ enthält (**Tabelle 4**). Viele Programme übersetzten bei der Translation die degenerierte Base mit einem Platzhalter (z. B. „?“ beim Programm „transeq“ des EMBOSS-Programmpakets). Das neu entwickelte Programm „**dna2aa**“ berechnete nun die sich ergebenden Kombinationsmöglichkeiten, verhinderte einen Informationsverlust und ermöglichte im vorliegenden, konstruierten Idealfall die Beschränkung auf

eine eindeutig definierte Aminosäure. Beim Triplet „**TWG**“ ergeben sich für „W“ („weak“, d.h. mit einer „schwachen“ Wasserstoffbrückenbindung) als mögliche Nukleinsäuren Thymin (T) oder Adenin (A) und damit die möglichen Codons „**TAG**“ (Stopp-Codon) oder „**TTG**“ (Leucin). Da ein Stopp-Codon zum Kettenabbruch führen und somit die Replikation beenden würde, kann von diesen zwei Möglichkeiten nur Leucin als sinnvolle Lösung betrachtet werden. „**MGA**“ lässt als Nukleinsäuren Cytosin (C) oder Adenin zu – beide weisen eine Aminogruppe („M“ für **Amino**) auf. „**CGA**“ und „**AGA**“ codieren beide für Arginin, so dass die Position eindeutig definiert werden kann. Ähnliches gilt für „**YTA**“, wo „Y“ für die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin stehen. Sowohl „**CTA**“ als auch „**TTA**“ codieren für Leucin, so dass durch die IUPAC-Codierung auch hier eine eindeutige Bestimmung der Aminosäure möglich war.

Auch wenn die gewählten Beispiele sicherlich den Idealfall darstellen und eine solche Reduktion auf eine eindeutige Aminosäure nicht immer möglich ist, so vermag „**dna2aa**“ doch einen drohenden Informationsverlust durch Angabe aller denkbaren Aminosäure-Möglichkeiten zu umgehen und eine gewisse Einschränkung der Auswahl zu bewirken. Dies lässt sich gezielt nutzen, indem beispielsweise an Enzympositionen mit nur geringer Variabilität die Plausibilität der angegebenen Aminosäuren unterschiedlich gewichtet wird. Die Mehrdeutigkeit an einer Position kann aber auch als Ausdruck verschiedener HIV-Subspezies gewertet werden, was bezüglich Mutationsabfolgen und Resistenzentwicklung wertvolle Informationen liefert. Die so entstandenen Aminosäure-Sequenzen wurden in die Tabellen „**aa_Prot**“ und „**aa_RT**“ bzw. erweitert um die Patientenkennung in „**Prot_aa_patmvp**“ und „**RT_aa_patmvp**“ eingefügt.

Tabelle 4) Beispiele für degenerierte Basen: Basentriplets „**TWG**“, „**MGA**“ und „**YTA**“. Das Translationsprogramm "dn2aa" ermöglicht im Idealfall eine Reduktion der möglichen Permutationen. „**TWG**“ lässt sich auf „Leucin“, „**MGA**“ auf „Arginin“ und „**YTA**“ ebenfalls auf „Leucin“ reduzieren.

	Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3
Basentriplett	TWG	MGA	YTA
Programm „transeq“	? (Platzhalter)	? (Platzhalter)	? (Platzhalter)
IUPAC-Code	W = A oder T	M = A oder C	Y = C oder T
Permutationen	TAG, TTG	AGA, CGA	CTA, TTA
Programm „dn2aa“	Stopp-Codon; Leucin	Arginin	Leucin

3.7. Struktur der neu geschaffenen MvP-HIV-Datenbank

Die Tabellen „rt_fastalike“ und „prot_fastalike“, „rt_triplett“ und „prot_triplett“ sowie „aa_Prot“ und „aa_RT“ bilden die **Basisdaten** der HIV-Sequenz-Datenbank und ermöglichen eine gezielte Analyse von Mutationen auf DNS- und Protein-Ebene. Mit „Pat_ID_RT“ und „Pat_ID_Prot“ ist eine Zuordnung von Probennummer und Patientenkennung möglich.

Dank des PHPMyAdmin-Datenbankformats konnten verschiedenen Inhalte als **erweiterte Datensätze** miteinander kombiniert werden. Die Tabellen „aa:Prot_patient“ sowie „aa_RT_patient“ enthalten beispielsweise für jeden Patienten die Zahl der im zugeordneten Proben sowie für jedes Codon die Art und Anzahl der Permutationen. Sie erlauben einen Überblick über die Stabilität oder Variabilität an bestimmten Positionen. "aa_RT_just_1" und "aa_Prot_just_1" enthalten Daten von Patienten, die nur mit einer Sequenz vertreten sind, während "RT_4_more" bzw. "Prot_4_more" Patienten mit vier oder mehr Proben zuzuordnen sind. Insbesondere zur Analyse von Veränderungen innerhalb des HIV-Genoms während des Krankheitsverlaufs ergeben sich hieraus Informationen.

3.8. Auswertungen - Hilfsmittel und Anwendungsmöglichkeiten

Die SQL-Struktur der Datenbank ermöglichte gezielte Abfragen etwa bezüglich der Häufigkeit einzelner Mutationen, so dass beispielsweise das Auftreten relevanter Mutationen, wie sie von der Stanford-Database angegeben werden, analysiert werden konnte (Stanford University Drug Resistance Database, "Resistance Notes"). Zur Archivierung der Mutationen wurde Excel im Programm-Paket von Windows 2000 verwendet. Das Tool "Mutation Profiles" erlaubte es, die Häufigkeiten mit denen der Stanford Database zu vergleichen (Stanford University Drug Resistance Database, "Mutation Profile").

Zur Überprüfung der Subtypen wurden die abgefragten Probennummern in das Assistenzprogramm "getfasta" (Obermeier, "getlistv2") exportiert, mit dessen Hilfe die Sequenzen im fasta-Format extrahiert und in das Resistenzanalyseprogramm "GRADE" eingespeist (HIV GRADE e.V.) wurden.

Die **Anwendungs- und Abfragemöglichkeiten** der Datenbank sind zahlreich und würden den Rahmen dieser Dissertation sprengen. Aus diesem Grunde werden im Folgenden exemplarisch einige relevante Anwendungen gezeigt, in dem Wissen, dass die Datensätze beliebig erweitert werden können und weitere Analysen jederzeit möglich sind.

4. Ergebnisse

Als ein Anwendungsbeispiel wurde untersucht, wie oft in der MvP-HIV-Sequenz-Datenbank an ausgewählten Positionen Abweichungen vom Wildtyp-Virus vorlagen. Darüber hinaus wurden mittels Analyse des Auftretens von Mutationen in chronologischer Reihenfolge Rückschlüsse auf sog. Mutationspfade gezogen. Außerdem galt ein besonderes Augenmerk einigen bevorzugt miteinander in Kombination auftretenden Mutationen. Zusätzliche Interpretationsmöglichkeiten zum Auftreten von Mutationen in Abhängigkeit vom Subtyp ergaben sich aus einer Analyse der Virus-Subtypen.

4.1. Prävalenz häufiger Mutationen

Die HIV-Datenbank enthält die Positionen 1 bis 99 der Virus-Protease und 1 bis 334 der Reversen Transkriptase. Es wurden Enzympositionen untersucht, für die eine Assoziation mit Arzneimittelresistenzen nachgewiesen oder zumindest stark vermutet wurde. Dies geschah in Anlehnung an die aktualisierten Informationen der ANRS, der Stanford University HIV Drug Resistance Database, der International AIDS Society-USA Drug Resistance Mutations Group oder anderer Organisationen (ANRS AC 11 Resistance Group; Stanford University, "Mutation Profile"; Johnson 2007 und 2008). Bei der Auswertung der Häufigkeit bestimmter Aminosäuren innerhalb der MvP-Datenbank wurden nur relevante Positionen berücksichtigt.

An den entsprechenden Codons wurde die Mutationshäufigkeit (Mut.) allgemein und ihre Veränderung vom Jahr 2000 bis Oktober 2004 analysiert. An mehrdeutigen Positionen wurde die Redundanz der Sequenzen durch Auflistung aller Möglichkeiten berücksichtigt. In manchen Fällen beinhaltete eine solche Permutation sowohl die Aminosäure des Wildtyps als auch Abweichungen davon. Bei der Auswertung wurden deshalb bei der Mutationshäufigkeit diejenigen Sequenzen berücksichtigt, die an der betreffenden Position definitiv keinen Wildtyp aufwiesen. Durch Ausschluss solcher unklarer Fälle erklären sich die geringere relative Häufigkeit und damit die an Hundert fehlenden Prozent.

4.1.1. MvP-Datenbank

In die Analyse **NRTI-assozierter Mutationen** wurden die RT-Codons 41, 44, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 115, 151, 184, 210, 215, 219 und 227 eingeschlossen (**Tabelle 1a – NRTI-assoziierte Mutationen**). Äußerst selten fanden sich Mutationen an den Enzympositionen 65 (Mut.: 2,1%; WT: 97,8%), Codon 75 (Mut.: 6,2%; WT: 93,5%), Codon 115 (Mut.: 0,7%; WT: 99,2%), Codon 151 (Mut.: 1,8%; WT: 98,2%) sowie Codon 227 (Mut.: 1,1%; WT: 98,7%). An den RT-Positionen 184

(Mut.: 41,5%; WT: 57,6%) und 215 (Mut.: 42,6%; WT: 56,7%) kamen annähernd gleich viele mutierte Varianten wie Wildtyp-Viren vor .

Hinsichtlich Veränderungen in der Mutationsrate im Laufe der Jahre zeigte sich bei den NRTI nur wenig Dynamik. An den Positionen 67, 69, 70, 74 und 210 schwankte die Mutationsfrequenz nur wenig, an den Stellen 75, 115, 151, 184, 219 und 227 war sie nahezu konstant. Bei M41 (Jahr 2000: 60,3%; Jahr 2004: 80,8%) sowie weniger ausgeprägt bei E44 (2000: 86,3%; 2004: 95,2%) und T215 (2000: 53,1%; 2004: 68,9%) ließen sich vermehrt Wildtyp- und weniger mutierte Viren verzeichnen, während an Codon 65 von 2000 bis 2004 eine deutliche Zunahme an Mutationen zu beobachten war (Mut. 2000: 0,5%; 2002: 0,7%; 2003: 5,5%; 2004: 9,6%).

Insertionen an Position 69 waren in der Datenbank nur selten zu finden. Nur je ein Patient wies dort in den Jahren 2000 bis 2002 die Insertionen G bzw. C auf.

Eine große Variationsbreite an Aminosäuren fand sich an den Positionen 67, 69, 70, 75 sowie besonders ausgeprägt an den Codons 210, 215 und 219. Dagegen mutierte K65 fast ausschließlich zu K65R, Y115 nur zu Y115F und Q151 zu Q151M.

Hinsichtlich **NNRTI-assoziierter Mutationen** wurden die Codons 100, 101, 103, 106, 181, 188, 190, 225 und 230 analysiert (**Tabelle 1b – NNRTI-assozierte Mutationen**). Insgesamt ergaben sich in der MvP-Datenbank hier deutlich weniger Abweichungen vom Referenzvirus als bei den NRTI-assozierten Mutationen. Die RT-Codons 100 (L100: 96,4%), 106 (V106: 96,3%), 188 (Y188: 96,5%), 225 (P225: 98,6%) und 230 (M230: 99,5%) wiesen fast nur Wildtyp auf. Etwas mehr Abweichungen zeigten sich bei K101 (WT: 89,6%), Y181 (WT: 85,5%) und G190 (WT: 88,5%). Über die Jahre zeigten sich allenfalls kleinere Schwankungen der Mutationsrate.

Eine geringe Variationsbreite an Aminosäuren wurde an den Codons 100, 225 und 230 nachgewiesen (L100I: 3,2%, Intermediärtyp 100IL: 0,2%; L100V: 0,1%; Intermediärtyp 225HP: 0,1%; P225H: 1,3%; Intermediärtyp 230IM: 0,2%; M230L: 0,3%).

Bei den **Proteaseinhibitor-assozierten Mutationen** wurden die Codons 10, 13, 16, 20, 24, 30, 32, 33, 35, 36, 41, 43, 46 bis 48, 50, 53, 54, 58, 60, 62, 63, 69, 71, 73, 74, 77, 82, 83 bis 85 sowie 88 und 90 untersucht (**Tabelle 2 – PI-assozierte Mutationen**). An den meisten dieser Stellen wurden äußerst niedrige Mutationsraten gefunden. Eine Rate zwischen 6 und 10% fand sich bei den Codons 60 (Mut.: 8,8%), 73 (Mut.: 9,0%) und 84 (Mut.: 8,1%). Zwischen 2 und 6% Gesamt-Mutationshäufigkeit wiesen die Positionen 16 (Mut.: 5,3%), 30 (Mut.: 2,9%), 32 (Mut.: 2,5%), 43 (Mut.: 5,5%), 47 (Mut.: 2,3%), 48 (Mut.: 4,0%), 53 (Mut.: 3,3%), 58 (Mut.: 4,5%) sowie 85 (Mut.:

2,6%) und 88 (Mut.: 3,5%) auf. Fast ausschließlich Wildtyp lag vor an den Codons 24 (WT: 98,9%), 50 (WT: 98,5%) und 83 (WT: 99,0%). Ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zwischen Wildtyp-Viren und mutierten Varianten ließ sich an Codon 36 nachweisen (WT M36: 57,6%; Mutanten: 40,8%). Codon 63 erwies sich als äußerst polymorphe Protease-Position (Referenz-Virus L63: 24,6%; Polymorphismen: 74,9%).

Beispiele für eine zunehmende Mutationsfrequenz über die Jahre sind die Codons 13 (Mut. Jahr 2000: 22,6%; 2004: 37,0%), 41 (Mut. Jahr 2000: 31,7%; 2004: 52,4%), Codon 47 (Mut. Jahr 2000: 0,7%; 2004: 3,9%), 60 (Mut. Jahr 2000: 7,2%; 2004: 13,6%) und 69 (Mut. Jahr 2000: 18,8%; 2004: 35,9%). An Codon 48 konnte eine vermehrte Tendenz zugunsten des Wildtyps festgestellt werden (Mut. Jahr 2000: 6,7%; 2004: 2,9%).

Hinsichtlich der Vielfalt gab es je nach Lokalisation innerhalb des Enzyms deutliche Unterschiede. I13 mutierte beispielsweise fast ausschließlich zu I13V (I13V: 28,5%; Intermediärtyp 13IV: 0,7%; I13A: 0,3%), D30 bei niedriger Mutationsrate meist zu D30N (D30N 2,8%; Intermediärtyp 30ND und D30Y: Je 0,1%). An Codon 35 war E35D die häufigste Variante (E35D: 32,9%; E35N: 1,1%; E35A/K/Q/V: Je 0,1%). I47 veränderte sich meist zu I47V (I47V: 2,3%; Intermediärtyp 47MI: 0,2%), I50 zu I50V (I50V: 1,1%); Intermediärtyp 50IMV/I50L: Je 0,1%) und I62 zu I62V (I62V: 28,1%; Intermediärtypen 62IV bzw. 62MI: 1,1% bzw. 0,1%). Ebenso veränderte sich Isoleucin an den Stellen 84 und 85 bevorzugt zu Valin (I84V: 7,9%; I85V: 2,5%). Dagegen mutierte Leucin an Codon 90 zu Methionin (L90M: 24,8%), ohne dass an anderen Positionen wie L10, L24, L33 oder L63 eine ähnliche Tendenz zu beobachten war. Eine große Variationsbreite an Mutationen fand sich an den PR-Codons 20, 54, 63, 69 und 71.

Die Ergebnisse gaben einen Überblick über das in der MvP-Datenbank erfasste Patientengut in den Jahren 2000 bis 2004.

4.1.2. Vergleich mit der Stanford HIV Drug Resistance Database

Die erhobenen Daten wurden mit denen der größeren Stanford University HIV Drug Resistance Database verglichen, um Aussagen über mögliche regionale Unterschiede treffen zu können. Die Anwendung "RT Mutation Profile" bzw. "Protease Mutation Profile" gab einen Überblick über die Häufigkeit und Art von Mutationen bei Patienten ohne antiretrovirale Behandlung sowie mit mindestens einem NRTI, NNRTI oder PI (Stanford University, "Mutation Profile").

Analog zur MvP-Datenbank fanden sich hinsichtlich **NRTI-assoziierter Mutationen** auch in der Stanford Datenbank nur selten Mutationen an den Codons 65 (MvP: 2,1%; Stanford: 1,4%), 75

(MvP: 6,2%; Stanford 2,9%), 115 (MvP: 0,7%; Stanford: 0,6%), Codon 151 (MvP: 1,8%; Stanford: 1,2%) und 227 (MvP: 1,1%; Stanford: 0,3%). An einigen Positionen gab es jedoch auch Unterschiede zu beobachten, beispielsweise an den RT-Codons 41 (Mut. MvP: 31,9%; Stanford: 16,4%), 44 (Mut. MvP: 10,9%; Stanford: 4,5%), 67 (Mut. MvP: 30,2%; Stanford: 16,4%), 184 (Mut. MvP: 41,5%, Stanford: 21,4%), 210 (Mut. MvP: 22,2%, Stanford: 11,0%) und 215 (Mut. MvP: 42,6%, Stanford: 22,4%). Insertionen an Codon 69 traten in etwa gleich selten auf (MvP: 1,2%; Stanford: 0,6%).

NNRTI-assozierte Mutationen tauchten in der MvP-Datenbank fast durchgängig häufiger auf als in der Stanford HIV Database. Dies ließ sich an den RT-Codons 101 (Mut. MvP: 9,6%; Stanford: 4,2%), 103 (Mut. MvP: 24,9%; Stanford: 11,8%), 181 (Mut. MvP: 13,6%; Stanford: 5,5%), 188 (Mut. MvP: 3,4%; Stanford: 1,6%), 190 (Mut. MvP: 10,9%; Stanford: 4,0%) und 225 (Mut. MvP: 1,3%; Stanford: 0,7%) beobachten. Allerdings zeigten sich in der Gruppe der vorbehandelten Patienten in der Stanford-Datenbank mehr Abweichungen vom Wildtyp als in den MvP-Datensätzen. Zwei der untersuchten Codons wiesen in beiden Datenbänken nur den Wildtyp oder eine einzige Mutation und damit eine geringe Variationsbreite auf, so L100 mit Mutation L100I und P225 mit P225H. In der MvP-Datenbank kam an Codon 230 nur M230L mit äußerst geringer Häufigkeit vor (0,3%), während in der Stanford-Datenbank immerhin auch M230ILV beobachtet wurden. K101N kam nur in den amerikanischen Daten, K101A und K101V nur in den MvP-Sequenzen vor. V106I, Y181C, Y188L und G190A waren in beiden Datenbanken die häufigsten und beinahe einzigen Mutationen an ihren jeweiligen Positionen. K103DHI, V106G und Y188DF fanden sich nur im Münchener Patientengut.

Innerhalb der Stanford HIV-Datenbank gab es bei den **PI-assozierten Mutationen** Unterschiede zwischen unbehandelten und vorbehandelten Patienten. Ohne Therapieerfahrung fanden sich häufiger Abweichungen vom Referenzvirus an den Codons 13 (I13V; ohne Vortherapie: 37,1%; vorbehandelt: 32,0%), 16 (G16E; ohne Vortherapie: 8,1%; vorbehandelt: 4,7%), 36 (M36I; ohne Vortherapie: 54,0%; vorbehandelt: 45,9%), 41 (R41K; ohne Vortherapie: 58,6%; vorbehandelt: 31,8%) und 69 (H69K; ohne Vortherapie: 45,2%; vorbehandelt: 12,5%). An manchen Positionen war die Mutationsfrequenz in der Stanford-Datenbank höher als in der MvP-Datenbank, beispielsweise an PR-Codon 24 (Mut. MvP: 0,9%; Stanford: 3,7%).

In den MvP-Sequenzen fielen hauptsächlich an Positionen mit geringer Variationsbreite an Aminosäuren einige seltene Polymorphismen auf, die in der amerikanischen Datenbank nicht genannt und allenfalls von wenigen Autoren in Zusammenhang mit der Verabreichung

antiretroviral Medikamente interpretiert wurden. G16Q trat beispielsweise in der MvP-Datenbank mit einer Häufigkeit von 0,1% auf und wurde in Zusammenhang mit Nelfinavir-Exposition als seltene Mutationen beschrieben (Stanford University Drug Resistance Database, <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/GetPRIIsolateData.cgi?IsolateID=7917>). Die Stanford-Datenbank führte außerdem zum Zeitpunkt der Auswertungen D30Y (Mut. MvP: 0,1%) nicht auf, in einer Publikation wurde sie als primäre PI-Resistenzmutation beschrieben (Brenner 2000). Ähnliches galt für Mutationen an Codon 32: V32A wurde zwar als "major mutation" mit einer Resistenzentwicklung assoziiert (Yang 2005), V32G und V32E wurden jedoch nicht genannt (MvP: Je 0,1%). Q58K (Mut. MvP: 0,1%) wurde bei einem mit HIV-2 infizierten Patienten aus Afrika gefunden, D60G in einem Isolat eines unbehandelten Patienten (Pieniazek 2004; Stanford University, Sequence Reference). I62T (MvP: 0,2%) wurde üblicherweise als Polymorphismus interpretiert, aber aufgrund einer deutlichen lokalen Häufung auch als molekularer Marker einer Epidemie von Subtyp B-Viren in Venezuela beschrieben; I62L (MvP: 0,1%) wurde eine deutlich eingeschränkte Enzymfunktion zugeschrieben (Bouchard 2007; Parera 2007). N83I wurde mit einer verminderten Substratbindung der Protease assoziiert, die Bedeutung von N83H und N83Y (MvP: Je 0,2%) wurde nicht weiter untersucht (O'Loughlin 2006). Für N83T (MvP: 0,1%) wurde bei Subtyp-B-Viren eine Resistenz gegenüber Nelfinavir postuliert (Gonzalez L.M. 2004). I85N (MvP: 0,1%) ließ sich außerhalb der MvP-Datenbank in einem brasilianischen Virusisolat nachweisen (Tanuri 1999). An Codon 90, wo L90M als vorherrschende Resistenzmutation beschrieben wurde, fanden sich in der Datenbank die seltenen Polymorphismen L90I, L90S, L90W (MvP: Je 0,1%) und L90V (MvP: 0,2%). 90V wurde im Rahmen einer Studie über seltene Mutationen bei Non-B-Viren in einem Isolat beschrieben, war im MvP-Patientenkollektiv jedoch dem Subtyp B zuzuordnen. L90IS wurde bei einem Patienten unter Indinavir-Therapie beschrieben (Holquín 2004, Vasudevachari 1999, Zhang 1997). In der MvP-Datenbank wies die 90S-positive Protease-Sequenz den Subtyp D auf.

4.2. Sequentielles Auftreten von Mutationen unter antiretroviral Therapie

Die nach dem Zeitpunkt der Sequenzanalyse vergebene MvP_ID kann dabei helfen, in der MvP-Datenbank zeitliche Zusammenhänge bei der Entstehung von Mutationen zu erkennen. Als sog. Schlüsselmutationen sind manche von ihnen stark mit einer antiretroviralen Substanz oder Substanzklasse assoziiert. Hinweise darauf können das Neuauftreten einer vorher nicht beschriebenen oder das vermehrte Auftreten einer vorher seltenen Mutation kurz nach Zulassung eines neuen Medikaments sein.

Exemplarisch wurden Tenofovir und Atazanavir, die beide zwischen 2000 und Oktober 2004 zugelassen wurden, sowie die etablierte Substanz Zidovudin (AZT) untersucht.

Tabelle 5) Sequentielles Auftreten von Mutationen unter antiretroviraler Therapie

Tabelle 5a) TDF und K65R

	Gesamt	2000	2001	2002	2003	2004
[%]	2,36	0,99	0	0	8,51	5,88
K65R	13	2	0	0	8	3
Sequenzen (absolut)	550	203	91	111	94	51

Tabelle 5b) AZT und M41L

	Gesamt	2000	2001	2002	2003	2004
[%]	27,32	35,96	25,72	21,82	24,47	13,73
M41L	150	73	23	24	23	7
Sequenzen (absolut)	549	203	91	110	94	51

Tabelle 5c) Atazanavir und I50L

	Gesamt	2000	2001	2002	2003	2004
[%]	0,17	0	0	0	0	1,96
I50L	1	0	0	0	0	1
Sequenzen (absolut)	560	212	92	103	102	51

4.2.1. Tenofovir und die Mutation K65R

Tenofovir (TDF) ist ein nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NRTI) und wurde in den USA im Oktober 2001 sowie in Deutschland im Februar 2002 zugelassen (AIDSinfo, "AIDSinfo Drug Database"; Lode, http://www.zct-berlin.de/tabellen/virust_retro.html). Als Schlüsselmutation für TDF fand man die RT-Mutation K65R, die zu intermediärer Resistenz gegen TDF und Überempfindlichkeit für AZT führt (Shafer, "Antiretroviral drug summary: Tenofovir (TDF; Viread)"). In der MvP-Datenbank ließ sich bei 13 von 550 Sequenzen eine Mutation nachweisen (=2,36%), wobei ausnahmslos K65R vorlag (**Tabelle 5a**). Im Jahr 2000 wiesen 2 von 203 (=0,99%) Sequenzen K65R auf; die Mutation trat dann erst wieder im Jahr 2003 bei 8 von 94 (=8,51%) und 2004 bei 3 von 51 Sequenzen (=5,88%) auf.

4.2.2. Zidovudin (AZT) und die Mutation M41L

Der NRTI Zidovudin (AZT) wurde als erstes antiretrovirales Medikament 1987 zugelassen und zeigt exemplarisch die Persistenz von Mutationen bei Langzeithand. Schon früh wurde eine Assoziation zwischen der Mutation M41L, die zu den Thymidin-Analoga-Mutationen (TAM) zählt, und einer AZT-Therapie gefunden (Bächi, www.hiv.ch; Shafer, "Antiretroviral drug summary: Zidovudine (ZDV; Retrovir)"). Bei 151 von 549 Sequenzen (=27,5%) aus der MvP-Datenbank

traten überhaupt Mutationen an RT-Codon 41 auf; 150 von ihnen (150/151 Sequenzen = 99,3%) zeigten M41L (**Tabelle 5b**).

4.2.3. Atazanavir (PI) und Mutation I50L

Der Protease-Inhibitor Atazanavir wurde erstmals im März 2004 in der EU zugelassen (Lode, „Atazanavir - ein neuer Proteaseinhibitor zur einmal täglichen Gabe“). Als Schlüsselmutation wurde I50L beschrieben. In der MvP-Datenbank ließ sich am PR-Codon 50 bei 1221 von 1239 Sequenzen der Wildtyp Isoleucin nachweisen, was einer Häufigkeit von 98,5% entsprach (**Tabelle 5c**). Entsprechend niedrig war die Mutationsfrequenz (1,5%). In den Jahren 2000 bis 2003 war I50L nicht in der Datenbank zu finden und konnte erstmals im Oktober 2004 nachgewiesen werden.

4.3. Einfluss neu beschriebener HIV-1-RT-Mutationen auf die Resistenz

Die neu entstandene MvP-Datenbank erlaubt außerdem einen Vergleich mit anderen Datenbanken, so dass Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen verglichen und so Aussagen über regionale Unterschiede getroffen werden können. Dies soll am Beispiel einer Studie aus dem Jahr 2006 gezeigt werden: Eine italienische Forschungsgruppe unter *Saracino* beschrieb über 10 Positionen der Reversen Transkriptase, welche bis zum Jahr 2005 in der Liste der International AIDS-Society (IAS) nicht aufgeführt worden waren und damit nicht als Resistenz-relevant eingestuft wurden (Saracino 2006). Untersucht wurden 102 Patienten ohne und 226 mit antiretroviraler Behandlung. Es wurden ausschließlich Sequenzen verwendet, für die sowohl genotypische Daten als auch phänotypische Testergebnisse vorlagen. Untersucht wurden Abweichungen der Aminosäure-Sequenzen von einer HIV-1-Consensus-Sequenz, die bei mindestens 4% der in die Studie eingeschlossenen Patienten auftraten. Es wurden neue, vorher nicht als Resistenz-relevante Mutationen gefunden, die mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber NRTI (u. a. K20R, T39A, K43EQN, E203KD, H208Y, D218E) oder NNRTI (K101EQP, H221Y, K223EQ, L228HR) einher gingen. Aufgrund der Vielzahl an Variablen konnte die postulierte Assoziation zwischen Mutation und Resistenz in multivariaten Analysen zwar nicht bestätigt werden; auch wurde aufgrund der limitierten Patientenzahl eine mögliche Fehlbewertung an einzelnen Positionen eingeräumt. Dennoch zeigte sich in vorangegangenen univariaten Analysen eine Assoziation der genannten Mutationen mit einer verminderten NRTI- bzw. NNRTI-Empfindlichkeit. Deshalb kamen die Autoren zu dem Schluss, dass diese vor Veröffentlichung der Studie im Jahr 2006 von der IAS nicht aufgeführten Mutationen mit antiretroviraler Therapie und mit NRTI- bzw. NNRTI-Resistenz assoziiert seien.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Mutationen der zehn genannten RT-Positionen auch außerhalb des italienischen Patientenguts in mindestens 4% der Fälle auftraten und damit relevant waren, wurden die entsprechenden Positionen innerhalb von Stanford- und MvP-Datenbank untersucht. Außerdem wurde analysiert, ob die Mutationen - als mögliches Indiz für ein Therapie-assoziiertes Auftreten - im Laufe der Jahre in der MvP-Datenbank vermehrt auftraten. Gleichzeitig ließ sich mit Hilfe der Stanford-Datenbank die Prävalenz der entsprechenden Mutationen bei Patienten mit und ohne antiretrovirale Therapie vergleichen und auch auf diese Weise ein möglicher Zusammenhang der neu beschriebenen Resistenzmutationen mit der HIV-Therapie überprüfen. Traten die Mutationen in der MvP-Datenbank auf, so wurde außerdem der Subtyp der jeweiligen Sequenz untersucht; kamen vermehrt Non-B-Subtypen vor, musste die Möglichkeit eines natürlichen Polymorphismus an dieser Position in Betracht gezogen werden. Tabelle 6 (Anhang, **Tabelle 6 – Neu beschriebene Mutationen**) fasst die Ergebnisse der Datenabfragen zusammen.

Für Mutationen an Codon 20 wurde in der italienischen Studie eine signifikante Assoziation mit NRTI-Resistenzen postuliert. In der MvP-Datenbank stieg die Mutationshäufigkeit an dieser Position bis zum Jahr 2004 auf 21% an. 130 Sequenzen mit **K20R** wiesen Subtyp B und 47 einen Non-B-Subtyp auf, darunter je zwei Sequenzen mit den Subtypen CRF02_AG, F oder K, fünf mit Subtyp C, 11 mit G-, 12 mit CRF01_AE- und 13 mit A-Subtyp. In der Stanford-Datenbank kam die Mutation am häufigsten bei Subtyp-B-Viren vor; dazu gehörten 228 Patienten ohne RTI-Erfahrung, 349 mit NRTI- und 310 mit NNRTI-Behandlung.

Die relative Häufigkeit von **T39A** nahm von 15% im Jahr 2000 auf 27% (2003) bzw. 24% (2004) zu. In der Stanford-Datenbank fand sich ein Unterschied zwischen behandlungsnaiven und vorbehandelten Patienten: Ohne Vortherapie kam die Mutation bei Non-B- (174 Patienten) und Subtyp-B-Viren (103 Patienten) ähnlich häufig vor. In der Gruppe mit NRTI-Behandlung war T39A deutlich bei Non-B-Viren seltener (55 Patienten) und bei Subtyp-B-Viren häufiger (234 Patienten; Shafer, "HIVseq Program: Mutation List Analysis"). Im italienischen Patientengut wurde eine Resistenz v.a. gegenüber D4T, AZT und ABC festgestellt. In der MvP-Datenbank ließen sich RT-Sequenzen mit T39A meist dem Subtyp B zuordnen (72,2%) und in über einem Viertel der Fälle einem Non-B-Subtyp (Subtyp A: 4,0%; C: 2,4%; D: 3,2%; F: 10,3%; G: 1,6%; K und CRF01_AE: Je 0,8%; CRF02_AG: 4,8%).

Die relative Häufigkeit von **K43EQN** nahm in der MvP-Datenbank kontinuierlich ab (Jahr 2000: 14%; 2004: 10%); K43E ließ sich am häufigsten nachweisen. Auch hier zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Virus-Subtypen: K43Q und N traten in der Stanford-Datenbank in

der Gruppe ohne Vorbehandlung nur in Zusammenhang mit Subtyp CRF02_AG und ansonsten nur bei Patienten mit Therapieerfahrung auf. Ungeachtet der Vorbehandlung kam K43E bevorzugt bei Viren des Subtyps CRF01_AE vor (ohne Vortherapie: 384 Patienten; NRTI-Therapie: 186 Patienten; NNRTI-Therapie: 107 Patienten). In der MvP-Datenbank zeigte sich K43N (20 von 20 Sequenzen) und K43Q (45 von 46 Sequenzen; Ausnahme: 1 Sequenz mit Subtyp G) fast ausschließlich bei Subtyp-B-Viren. Hingegen hatten etwa ein Viertel aller Sequenzen mit K43E ebenfalls den Subtyp CRF01_AE (25,8%); die übrigen Sequenzen wiesen dennoch Subtyp B auf (Subtyp B: 69,7%; Non-B: 30,3%).

Die Häufigkeit von **E203KD** schwankte zwischen minimal 7,8% und maximal 10,4%. Die Stanford-Datenbank listete bei Therapie-naiven Patienten fast ausschließlich E203D als Mutation auf, allerdings selten. E203K kam nur bei Patienten mit RTI-Behandlung vor. In der MvP-Datenbank hatten Sequenzen mit Nachweis von E203KD meist Subtyp B (E203K: 89,9%; E203D: 85,4%); Non-B-Viren schienen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (E203K: 10,1%, davon Subtypen A, F, K in je 2,5% und G bzw. CRF02_AG in 1,3% d.F.; E203D: Subtyp C in 4,9%, Subtypen A, F, K, CRF01_AE in 2,4% d.F.).

Auch **H208Y** wurde von der Saracino-Arbeitsgruppe als Resistenz-relevante Mutation angesehen. Ihre relative Häufigkeit nahm von 6,2% (2000) auf 8,4% (2001) zu und fiel im Jahr 2004 wieder ab (7,0%). In der amerikanischen Datenbank wurde H208Y nur bei Patienten mit Vorbehandlung nachgewiesen, v.a. bei Subtyp B (NRTI-Therapie: 140 Patienten; NNRTI-Therapie: 175 Patienten) und seltener bei Subtyp F (NRTI-Therapie: 4 Patienten; NNRTI-Therapie: 8 Patienten). Ähnliches ließ sich in der MvP-Datenbank nachweisen: 95,4% der Sequenzen wiesen Subtyp B auf, nur 3,5 % der Sequenzen zeigten Subtyp F und 1,2% Subtyp K.

Die Häufigkeit von **D218E** nahm bis zum Jahr 2004 zu (Jahr 2000: 4,3%; 2004: 8,8%) bei abnehmender Probenzahl. In der Stanford-Datenbank wies nur 1 Patient ohne Vorbehandlung D218E auf (Subtyp G), ansonsten war die Mutation nur bei Personen mit antiretroviraler Therapie zu finden, insbesondere zusammen mit Subtyp CRF01_AE (NRTI: 12 Patienten; NNRTI: 13 Patienten) und B (NRTI: 115 Patienten; NNRTI: 132 Patienten). In der MvP-Datenbank fand sich die Mutation in 76,8% der Fälle in Kombination mit Subtyp B und in immerhin 23,2% d. F. mit einem anderen Subtyp (Subtypen D und F: Je 5,8%; Subtyp CRF01_AE: 4,4%; Subtyp A: 2,9%; Subtypen C, G, CRF01_AG: Je 1,5%).

In der Studie wurden Mutationen der RT-Codons 101, 221, 223 und 228 als Resistenz-relevant und NNRTI-assoziert eingestuft. An Codon 101 betrug die Mutationshäufigkeit in der MvP-Datenbank

etwa 10% (118 von 1226 Sequenzen), bei 94 dieser Sequenzen (80%) ließ sich **K101EPQ** nachweisen. K101E kam bei 56 Sequenzen vor, darunter 6 mit Subtyp C, je 1 mit Subtyp CRF01_AE, D, F und G sowie 46 mit Subtyp B. In der Stanford-Datenbank wurde K101P ausschließlich bei Patienten mit NNRTI-Behandlung aufgelistet und kam häufiger bei Subtyp-B-Viren (Subtyp B: 26 Patienten; Non-B-Subtyp: 9 Patienten) vor. In der Münchner Datenbank wiesen alle 3 K101P-positiven Sequenzen den Subtyp B auf. K101Q ließ sich nur bei 7 Non-B-Viren nachweisen, alle anderen zählten ebenfalls zu Subtyp B.

Die Mutationsfrequenz an RT-Position 221 betrug in der MvP-Datenbank etwa 4% (51 von 1239 Sequenzen). Dabei fand sich in 98% der Fälle **H221Y**; die Häufigkeit der Mutation nahm nur intermittierend im Jahr 2003 auf 5,2% zu und schwankte ansonsten um 3% (Jahr 2000: 3,3%; 2004: 3,0%) ab. In der Stanford-Datenbank zeigte sich H221Y gehäuft bei Patienten mit NNRTI-Behandlung (157 Patienten; Subtyp B: 114 Patienten; Non-B-Viren: 43 Patienten). Nur ein einziger Patient ohne bzw. mit NRTI-Vorbehandlung wies hier H221Y auf (ohne Therapie: Subtyp F; NRTI-Therapie: Subtyp F). In der MvP-Datenbank zeigten 74% der H221Y-positiven Sequenzen Subtyp B auf und entsprechend 26% einen Non-B-Subtyp (Subtyp C: 8%; G: 6%; A: 4%; D, F, CRF01_AE und CRF02_AG: Je 2%).

An Codon 223 betrug die Mutationsrate ebenfalls etwa 4% (49 von 1238 Sequenzen), wovon etwa 80% die Mutationen **K223EQ** aufwiesen. In der MvP-Datenbank schwankte die Häufigkeit beider Mutationen zwischen 3,4% (2000) und 5,2% (2001), eine Zunahme bis zum Jahr 2004 zeigte sich nicht (3,9%). In der Stanford-Datenbank kamen die Mutationen nur bei vorbehandelten Patienten vor, am häufigsten in Kombination mit dem Subtyp B (K223E: 33 Patienten; K223Q: 50 Patienten unter NNRTI). Selten lag auch Subtyp CRF01_AE vor (K223E: 3 Patienten, K223Q: 5 Patienten unter NNRTI). In der MvP-Datenbank kamen K223EQ fast ausschließlich bei Subtyp B vor (K223E: 16 Sequenzen mit Subtyp B [88,9%], 2 mit Subtyp K [11,1%]; K223Q: 20 Sequenzen mit Subtyp B [95,2%], 1 mit Subtyp F [4,8%]).

Das Münchner Patientenkollektiv wies für das RT-Codon 228 eine Mutationsfrequenz von 11% (136 von 1230 Sequenzen) auf, davon fast ausschließlich **L228HR** (134 von 136 Sequenzen). Von 2000 bis 2002 schwankte die relative Häufigkeit der Mutation um 10%, nahm zum Jahr 2003 deutlich zu (15,6%) und fiel 2004 leicht ab (12,6%). Die Stanford-Datenbank listete nur bei 4 Patienten ohne Vorbehandlung L228H auf (Subtyp F: 3 Patienten; G: 1 Patient), während L228HR unter NNRTI-Therapie bei fast allen Subtypen deutlich häufiger vorlag, v.a. bei Subtyp B (L228H: 178 Patienten; L228R: 86 Patienten unter NNRTI-Therapie). 86,7% der MvP-Sequenzen mit L228H wiesen Subtyp B auf, 13,3% einen anderen Subtyp (Subtypen A, C, D, CRF02_AG: Je 2,7%;

Subtypen F, CRF01_AE: Je 1%). Etwa drei Viertel der MvP-Sequenzen zeigten L228R in Kombination mit Subtyp B (75,4%), ein Viertel andere Subtypen (Subtyp C: 7,0%; Subtyp F: 8,8%; Subtypen G, K: Je 1,8%; Subtyp CRF01_AE: 5,3%).

4.4. Resistenzpfade

Neben der Analyse einzelner Mutationen, die oft Therapie-assoziiert auftreten, zu einem selektiven Vorteil für das betroffene Virus führen und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber antiretroviralen Substanzen bewirken können, ist gerade die Interaktion verschiedener Mutationen und die Reihenfolge ihres Auftretens bis hin zur Resistenzentwicklung von Interesse. Das Verständnis solcher Mutationsabfolgen kann dazu beitragen, Resistenzmechanismen nachzuvollziehen und Therapiestrategien zu verbessern. Die neu aufgebaute Datenbank ermöglicht es vor diesem Hintergrund durch die große Anzahl enthaltener Sequenzen und durch longitudinale Patientendaten aus knapp fünf Jahren, solche Resistenzpfade zu analysieren. Als Anwendungsbeispiele wurden Mutationsabfolgen gewählt, die unter Therapie des seit 1987 etablierten NRTI Zidovudin (AZT) beobachtet worden waren (Boucher 1992). AZT-assoziierte Mutationen werden zu den Thymidin-Analoga-Mutationen (TAM) bzw. wegen häufiger Kreuzresistenzen zu fast allen anderen Nukleosid-Analoga auch zu den Nukleosid-Analoga-Mutationen (NAM) gezählt.

Man unterscheidet bei den TAM zwei Resistenzpfade, den sog. klassischen Pfad (Larder 1989, Kellam 1992, Hooker 1996) und den Multinukleosid-Resistenzpfad (Shafer 1994, Shirasaka 1995, Schmit 1996, Zaccarelli 2004). Zum ersten gehörten die Mutationen M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F und K219 Q/E, welche zur Resistenz gegenüber AZT und auch d4T führen. Zum zweiten Mutationspfad zählt man V75I, F77L, F116Y und Q151M, welche zu multiplen Resistzenzen gegenüber nukleosidischen und nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren führen. Insertionen und Deletionen in der Region der Enzym-"Finger"-Subdomäne können ebenfalls zur Resistenzbildung beitragen. Betrachtet man den klassischen Resistenzpfad, so findet sich als erste Mutation meist K70R oder T215FY (Winters 1998, Hirsch 2000/2008, Beerewinkel 2005). Oft folgen andere Mutationen in typischer Reihenfolge. Liegt zuerst T215Y oder F vor, dann treten als nächstes häufig M41L auf und später L210W, E44D und V118I. Dieser 215-41-Pfad wird im Folgenden Mutations-Ast 1 genannt. Ähnliches gilt für K70R, eine Mutation, auf die gehäuft K219E/Q, D67N und T69D/N folgen. Dieser 70-219-Pfad soll im Weiteren als Mutations-Ast 2 bezeichnet werden.

Klassischerweise wird bei der Entwicklung von TAM eine Divergenz der Resistenzpfade

beschrieben, so dass zunächst entweder T215FY oder K70R entstehen, beide Schlüsselmutationen aber nicht gleichzeitig auftreten sollten. In der Stanford-Datenbank ließen sich dennoch über 1150 Sequenzen isolieren, bei denen K70R und T215F in Kombination vorlagen (Shafer, "NRTI Mutation Pattern & Susceptibility"). Auch in der MvP-Datenbank fanden sich 62 Sequenzen mit dem Muster K70R-T215F und 48 mit K70R-T215Y. 105 Sequenzen wiesen K70R, aber weder T215F noch Y auf. 315 T215Y-positive und 34 T215F-positive Sequenzen zeigten K70R nicht. Dennoch fanden sich typische Beispiele für die beschriebenen Mutations-Äste (**Tabelle 7 – Klassischer Resistenzpfad**).

Als Beispiele für **Mutations-Ast 1** wurden zwei Patienten ausgewählt (**Tabelle 7b**). Bei Patient 1 konnten insgesamt 4 Proben sequenziert werden. In den Jahren 2000 und 2001 wies er ausschließlich T215Y auf, während im Jahr 2002 M41L und L210W hinzukamen. Patient 2 war mit 5 Sequenzen vertreten. Im Jahr 2000 ließen sich bereits die Mutationen T215Y, M41L und L210W nachweisen, 2002 zeigte sich zusätzlich die Mutation E44D, die sich im Laufe des Jahres 2003 wieder zurückbildete. Eine erneute Testung im Juli 2003 ergab T215S, im September des gleichen Jahres entwickelte der Patient erneut die Mutationen T215Y, M41L und L210W.

Für den **Mutations-Ast 2** ließen sich drei passende Beispiele finden (**Tabelle 7c**): Patient 3 wies in den vier vorliegenden Sequenzen aus den Jahren 2000 bis 2002 die Ausgangsmutation K70R auf sowie 219KE als Intermediärtyp zwischen Wildtyp und Mutation. Indem bei der Erstellung der MvP-HIV-Datenbank die Ambiguität von Positionen mit degenerierten Basen beibehalten worden war, gelang die Erfassung solcher Übergangsformen. Patient 4 zeigte bei erster Testung im Jahr 2000 die Mutation T69M, die bislang nicht als Resistenz-relevant beschrieben wurde und sich bei zweiter Testung im selben Jahr bereits nicht mehr fand. 2001 trat K70R auf, später folgte K219E, während an Position 67 sowohl Wildtyp (Aspartat, D) als auch Asparagin (N) beobachtet werden konnten. Hier fand wiederum der Übergang zur Resistenzmutation statt, der sich mit Auftreten der ersten drei Mutationen des Astes 2, K70R, K219E und D67N, bis zum Jahr 2003 vollends vollzogen hatte. Patient 5 wies die Ast-2-typischen Mutationen K70R, K219E und auch T69D auf. Im Jahr 2003 kam es zur Mutation D67S, welche bislang in den offiziellen Resistenzalgorithmen nicht als relevant beschrieben wurde (Johnson 2008).

Tabelle 7 - Klassischer Resistenzpfad

Tabelle 7 a) Chronologische Reihenfolge der Ast-1- und Ast-2-Mutationen

Klassischer Mutationsweg Mutationen in chronologischer Reihenfolge	1.	2.	3.	4.	5.
Ast 1	T215 Y/F	M41L	L210W	E44D	V118I
Ast 2	K70R	K219 Q/E	D67N	T69D/N	

Tabelle 7 b) Patient 1 und 2: Beispiele für Ast-1-Mutationen (Reihenfolge durch Ziffern gekennzeichnet)

Reihenfolge des Auftretens	2.						3.	1.	
Patient 1									
Mutationen	M41L	E44D	D67N	T69DN	K70R	V118I	L210W	T215FY	K219QE
Sequenz 1 (2000)	M	E	D	T	K	V	L	Y	K
Sequenz 2 (2000)	M	E	G	T	K	V	L	Y	K
Sequenz 3 (2002)	L	E	D	T	K	V	W	Y	K
Sequenz 4 (2002)	L	E	D	T	K	V	W	Y	K

Reihenfolge des Auftretens	2.	4.					3.	1.	
Patient 2									
Mutationen	M41L	E44D	D67N	T69DN	K70R	V118I	L210W	T215FY	K219QE
Sequenz 1 (2000)	L	E	D	T	K	V	W	Y	K
Sequenz 2 (2002)	L	D	D	T	K	V	W	Y	K
Sequenz 3 (2003)	L	E	D	T	K	V	W	Y	K
Sequenz 4 (2003)	M	E	D	T	K	V	L	S	K
Sequenz 5 (2003)	L	E	D	T	K	V	W	Y	K

Tabelle 7 c) Patienten 3-5: Beispiele für Ast-2-Mutationen (Ziffern kennzeichnen die Reihenfolge des Auftretens)

Reihenfolge des Auftretens					1.				2.
Patient 3									
Mutationen	M41L	E44D	D67N	T69DN	K70R	V118I	L210W	T215FY	K219QE
Sequenz 1 (2000)	M	E	D	T	R	V	L	T	K
Sequenz 2 (2000)	M	E	D	T	R	V	L	T	K
Sequenz 3 (2001)	M	E	D	T	R	V	L	T	K
Sequenz 3 (2002)	M	E	D	T	R	V	L	T	KE

Reihenfolge des Auftretens			3.		1.				2.
Patient 4									
Mutationen	M41L	E44D	D67N	T69DN	K70R	V118I	L210W	T215FY	K219QE
Sequenz 1 (2000)	M	E	D	T	K	V	L	T	K
Sequenz 2 (2000)	M	E	D	T	K	V	L	T	K
Sequenz 3 (2001)	M	E	D	T	R	V	L	T	K
Sequenz 4 (2001)	M	E	DN	T	R	V	L	T	E
Sequenz 5 (2003)	M	E	N	T	R	V	L	T	E

Reihenfolge des Auftretens			3.	4.	1.				2.
Patient 5									
Mutationen	M41L	E44D	D67N	T69DN	K70R	V118I	L210W	T215FY	K219QE
Sequenz 1 (2000)	M	E	D	D	R	V	L	T	E
Sequenz 2 (2002)	M	E	D	D	R	V	L	T	E
Sequenz 3 (2003)	M	E	S	D	R	V	L	T	E
Sequenz 4 (2004)	M	E	S	D	R	V	L	T	E

4.5. Kombinationen von Mutationen

Auch ohne Berücksichtigung ihres zeitlichen Auftretens existieren charakteristische Mutationsmuster, die sich für Diagnostik und Therapie der HIV-Infektion nutzen lassen. Die Analyse bestimmter Kombinationen von Mutationen und ihrer Auswirkung auf virale Fitness und Resistenz könnte die Entwicklung antiretroviraler Wirkstoffe oder Therapieschemata vorantreiben, die durch gezielte Induktion einzelner oder kombinierter Mutationen die Funktionsfähigkeit beeinträchtigen.

Vor diesem Hintergrund wurden für Reverse Transkriptase und Protease Mutationen untersucht, die zusammen auftraten. So wurde für die RT-Mutationen **L100I** und **K103N** ein gehäuftes gemeinsames Auftreten unter Therapie mit Efavirenz beschrieben, wodurch sich die

Medikamentenresistenz signifikant erhöhte (HIV Resistance Web, "Mutation and Drug Data - Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors"). In der MvP-Datenbank zeigten die Isolate von 25 Patienten (25/801 Patienten = 3,1%) eine Mutation an Codon 100, davon 21 L100I (21/801 = 2,6%). Bei 262 Patienten zeigten sich an Position 103 Abweichungen vom Wildtyp Lysin (262/801 = 32,7%), bei 217 von ihnen lag K103N vor (=27,1%). 20 der 21 L100I-positiven Sequenzen wiesen gleichzeitig auch K103N auf, was eine Häufigkeit von 95,2% ergibt (**Tabelle 8a**).

	Patienten	[%]
Alle Mutationen an Position 100	25	3,12
L100I	21	2,61
Alle Mutationen an Position 103	262	32,67
K103N	217	27,06
L100I + K103N	20	2,49

Tabelle 8a) L100I und K103N (RT): 21 (von 801 Patienten) zeigten L100I, 20 von ihnen (=95,24%) in Kombination mit K103N.

Auch für die RT-Mutationen **E203K und D67N** wurde ein gemeinsames Auftreten beschrieben; die Mutationen wurden auch von der italienischen Arbeitsgruppe unter *Saracino* (vgl. Kapitel 4.3) als Resistenz-relevant eingestuft. Bei einer Gesamtzahl von 785 wiesen 45 Patienten, also 5,7%, E203K auf, so dass dies eine eher seltene Variante darstellte. Die allgemeine Mutationsrate an diesem Codons betrug in der MvP-Datenbank 10,8%. Dagegen lag bei 208 Patienten (=26,5%) D67N vor, insgesamt 243 (=31,0%) wiesen eine beliebige Mutation an dieser Stelle auf. Von den 45 Sequenzen mit E203K zeigten immerhin auch 25 D67N, was für diese Kombination eine Häufigkeit von etwa 56% ergibt (**Tabelle 8b**).

	Patienten	[%]
Alle Mutationen an Position 203	85	10,82
E203K	45	5,73
Alle Mutationen an Position 67	243	30,96
D67N	208	26,51
E203K + beliebige Mutation an Position 67	30	3,82
E203K + D67N	25	3,18

Tabelle 8b) E203K und D67N (RT): 45 (von 785 Patienten) zeigten E203K, 30 von ihnen zusätzlich eine beliebige Mutation an Position 67 auf, davon 25 D67N (=55,6%).

Daneben wurde untersucht, wie oft **E203K** mit verschiedenen **TAM** gemeinsam auftrat (**Tabelle 8c**). 37 der 45 Patienten (82,2%) mit E203K zeigten eine Mutation an Codon 215, meistens lag

T215Y oder F vor. M41L kam 32 Mal vor (=71,1%), L210W trat neben anderen Varianten bei 29 Sequenzen auf (=64,4%). Ebenso häufig ließ sich E203K kombiniert mit Mutationen an Codon 219 nachweisen (29/45 = 64,4%), E44L (bzw. andere Aminosäuren an Codon 44) dagegen in nur 35,6% (16/45 Patienten) und K70R in 28,9% der Fälle (13/45 Patienten).

E203K plus	Patienten	Häufigkeit [%]	E203K + zusätzliche Mutation
Beliebige Mutation an Position 41	32	4,08	71,11
M41L	32	4,08	71,11
Beliebige Mutation an Position 44	16	3,28	35,56
E44D	10	2,05	22,22
Beliebige Mutation an Position 70	13	2,68	28,89
K70R	13	2,68	28,89
Beliebige Mutation an Position 210	31	6,39	68,89
L210W	29	5,98	64,44
Beliebige Mutation an Position 215	37	7,62	82,22
T215F	5	1,03	11,05
T215Y	30	6,19	66,67
Beliebige Mutation an Position 219	29	5,98	64,44
K219Q	8	1,65	17,78
K219E	4	0,82	8,89

Tabelle 8c) E203K und TAM (RT): Gesamtzahl 785 Patienten, davon 45 mit E203K

Bei der Protease schienen Mutationen der Codons 41 und 69 bevorzugt in Kombination miteinander aufzutreten. **H69K** und **R41K** wurden mancherorts als natürlich vorkommende Polymorphismen v.a. bei Subtyp A und C beschrieben. In der MvP-Datenbank konnte bei 313 von 800 Patienten eine Mutation an Codon 41 nachgewiesen werden (39,1%), 292 davon waren zu Lysin (R41K; 292/800 = 36,5%) mutiert; H69K trat seltener auf (153/800 = 19,1%). Zusammen mit anderen Abweichungen an Codon 69 lag der Anteil bei 24,6% (197/800). Von den 153 Patienten mit H69K zeigten allerdings 131 zusätzlich R41K (=85,6%; **Tabelle 8d**). H69K ging in 91% der Fälle mit einem Non-B-Subtyp (Subtyp B: 9%; A: 18,5%; C: 23,0%; CRF02_AG: 24,8%; CRF01_AE: 18,5%; K, G, J: Zusammen 6,4%). R41K kam in 41,6% der Fälle bei Subtyp B vor (Subtyp A: 10,1%; C: 10,3%; D: 5,1%; CRF02_AG: 12,9%; CRF01_AE: 9,7%; F: 6,9%; G, K: Zusammen 3,4%). Bei Vorliegen von

R41K und H69K kam Subtyp B nur in einer Sequenz vor (0,5%), die Kombination war ansonsten vor allem mit den Subtypen A und CRF01_AE (jeweils 21,0%) sowie C (23,1%) und CRF02_AG (27,2%) assoziiert. Die Subtypen K (2,6%) und G (4,6%) kamen seltener vor.

	Patienten	[%]
Beliebige Mutation an Position 41	313	39,13
R41K	292	36,5
Beliebige Mutation an Position 69	197	24,63
H69K	153	19,13
R41K + H69K	131	16,38

Tabelle 8d) R41K und H69K (PR): 153 (von 800) Patienten zeigten H69K, davon 131 zusätzlich R41K (=85,62%).

4.6. Subtypisierung

Gängige Sequenzanalyse-Programme wie das "HIVSeq Program" der Stanford University, "geno2pheno" und "GRADE" greifen oft auf Algorithmen von Stanford HIV-Datenbank (Stanford University Drug Resistance Database, <http://hivdb.stanford.edu/pages/links.html>), ANRS (www.hivfrenchresistance.org) oder der Universität Leuven (Van Laethem, 2002; Katholieke Universiteit Leuven, <http://www.rega.kuleuven.be/cev>) zurück. Die HIV-typische genetische Diversität in Form von Subtypen und Mischformen stellt allerdings eine zunehmende medizinische und pharmakologische Herausforderung dar (Taylor B.S. 2008), die in der Resistenztestung vermehrt berücksichtigt werden muss. Da die getesteten Sequenzen meist mit einem Referenz-Virus des Subtyps B verglichen und Abweichungen davon als Mutationen bezeichnet werden, finden natürliche Polymorphismen in der Praxis oft zu wenig Beachtung. Solche Subtyp-spezifischen Variationen können mit einer primären Resistenz gegenüber antiretroviralen Substanzen einhergehen, so dass Therapieschemata, die sich hauptsächlich an Subtyp B-Viren orientieren, in diesem Falle nicht geeignet sind. In diesem Zusammenhang wurde die Prävalenz der verschiedenen Virus-Subtypen im MvP-Patientenkollektiv und in der Stanford-HIV-Datenbank verglichen. Letztere enthält als wichtige Zusatzinformation auch eine Auflistung der enthaltenen Subtypen. Als Anwendungsbeispiel wurden außerdem die Subtypen von RT-Sequenzen mit Mutationen an Codon 39 untersucht.

4.6.1. Prävalenz verschiedener Subtypen in der MvP-Datenbank

Zunächst wurden die enthaltenen Sequenzen durch das Resistenztestungs-Programm „GRADE“ subtypisiert. Von insgesamt 1246 RT-Sequenzen in der MvP-Datenbank konnten 1237 verwertet

werden, der Subtyp von neun Sequenzen konnte aufgrund größerer Lücken nicht eindeutig bestimmen. 976 der 1237 verwertbaren Proben (=79%) zeigten Subtyp B, 261 einen Non-B-Subtyp (=21%). Davon waren am häufigsten die Subtypen A und C nachweisbar (je 3,9%), knapp gefolgt von AE (3,5%) und G (3,0%). Die Prävalenz der Subtypen F, AG und D betrug 2,4%, 2,1% und 1,7%; selten war Subtyp K vertreten (0,6%), bei einer Sequenz fand sich Subtyp J.

4.6.2. Prävalenz verschiedener Subtypen in der Stanford Datenbank

Da die MvP-Datenbank keine Aussage über die Therapie-Erfahrung des Patientenkollektivs zuließ, wurde die Prävalenz der verschiedenen Subtypen mit den Daten der Stanford-HIV-Datenbank verglichen (Shafer, "HIVseq Program: Mutation List Analysis"). Zum Zeitpunkt der Abfrage im Jahr 2007 wurden 13349 Patienten aufgelistet, wovon 6329 keine Vortherapie mit Reverse-Transkriptase-Inhibitoren hatten und 4154 NRTI- bzw. 2866 NNRTI-Erfahrung hatten. Ungeachtet der Vorbehandlung wurde für den Subtyp B eine Prävalenz von ca. 60% errechnet, was etwa 7962 Sequenzen entsprach, und für alle Non-B-Subtypen eine Häufigkeit von etwa 40%. Davon waren Subtyp C mit 12,5% und CRF01_AE mit 8,2% am häufigsten, A und CRF02_AG mit 5,4% bzw. 5,1% in etwa gleich oft vertreten, gefolgt von G (3,6%), D (3,2%) und F (2,3%).

Berücksichtigte man die Vortherapie, so ergaben sich deutliche Unterschiede. Bei den RTI-naiven Patienten war B mit 43% zwar der häufigste Subtyp, insgesamt überwogen aber die Non-B-Viren mit 57%. Bei Vortherapie mit NRTI und auch NNRTI zeigte sich aber mit 82% bzw. 64% eine deutliche Dominanz des Subtyps B gegenüber Non-B mit 18% bzw. 36%.

4.6.3. Polymorphismen an RT-Codon 39

Nach dieser allgemeinen Subtypisierung der Sequenzen wurde untersucht, ob manche Abweichungen vom Wildtyp bevorzugt bei bestimmten Subtypen auftreten. Zu diesem Zweck wurde das RT-Codon 39 überprüft, das in den gebräuchlichen Resistenzlisten nicht als relevante Position geführt wurde. In einer spanischen Studie aus dem Jahr 2004, die bei HIV-Patienten aus der ehemaligen Sowjetunion Resistenz-assoziierte Mutationen mit den genetischen Polymorphismen des Virus verglich (Vazquez de Parga, 2004), wurde unter anderem die Mutation **T39K** beschrieben. Dies deckt sich mit Beobachtungen am Max von Pettenkofer-Institut, wonach die Mutation gehäuft bei Non-B-Viren auftritt. Um diese Hypothese verifizieren und quantifizieren zu können, wurde innerhalb der MvP-Datenbank nach Patienten gesucht, in deren RT-Sequenzen Mutationen am Codon 39 enthalten sind (**Bild 5 a-e**, **Bild 6 a-e**). Zunächst wurden T39K und T39E betrachtet, bei denen eine besondere Assoziation mit Non-B-Subtypen vermutet wurde.

In der MvP-Datenbank fanden sich 36 Sequenzen mit **T39K**, also Lysin ("K"), wovon 28 den Subtyp CRF01_AE aufwiesen (=77,8%; **Bild 5a**). Die Subtypen A und G kamen jeweils dreimal (=je 8,3%), B und C einmal (=je 2,8%) vor. Bei 35 von 36 Sequenzen, also mit einer Häufigkeit von 97%, lag ein Non-B-Subtyp vor und nur in einem von 36 Fällen Subtyp B. Die Stanford-Datenbank listete insgesamt 1322 Patienten mit T39K auf (1322/17289 Sequenzen = 7,6%). Davon kam Subtyp B mit einer relativen Häufigkeit von 3,0% (39/1322) vor, 1283 Isolate hatten einen anderen Subtyp ($1283/1322 = 97,0\%$). Analog zum MvP-Patientenkollektiv war CRF01_AE die häufigste Unterart mit einer im Vergleich leicht geringeren Häufigkeit von 74,6% (986/1322). Subtyp A war hier mit 8,7% (115/1322), C mit 6,1% (81/1322) vertreten, gefolgt von G mit 3,1% (41/1322) und AG mit 2,6% (35/1322). D und F kamen seltener vor (je ca. 1%) (**Bild 5b**).

Als nächster Schritt wurde – bei Nachweis von T39K – die Verteilung der Subtypen abhängig von der Therapieerfahrung untersucht. CRF01_AE kam in allen drei Gruppen am häufigsten vor: Ohne Vorbehandlung fand sich der Subtyp mit einer Häufigkeit von 75,4%, häufiger unter NRTI-Therapie (82%) und seltener unter NNRTI-Therapie (63,5%).

In der RTI-naiven Patientengruppe folgten nach CRF01_AE mit deutlichem Abstand die Subtypen A (8,7%), C (6,9%), G (3,8%) und AG (3,7%), D und F (0,6% bzw. 0,9%) wurden nur ausnahmsweise nachgewiesen (**Bild 5c**).

Bei den Patienten mit NRTI-Vorbehandlung waren neben Subtyp CRF01_AE nur B (22/233 = 9,4%) und A (9/233 = 3,9%) erwähnenswert. Die Subtypen C, G (je 1,7%), F (0,9%) und D (0,4%) kamen sehr selten vor, CRF02_AG trat nicht auf (**Bild 5d**).

Eine ähnliche Verteilung ergab sich bei den NNRTI-behandelten Patienten: CRF01_AE war am häufigsten, mit 13,7% Häufigkeit folgte Subtyp A. B und C (je 7,8%) kamen seltener vor (**Bild 5e**).

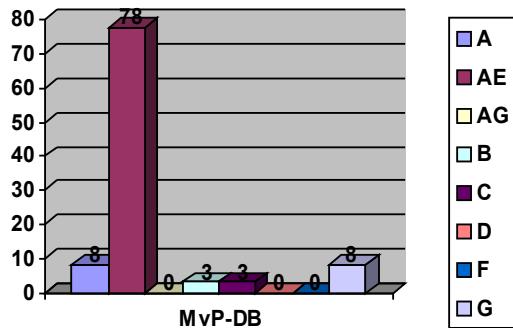


Bild 5a) T39K: Subtypen (MvP, alle Sequenzen)

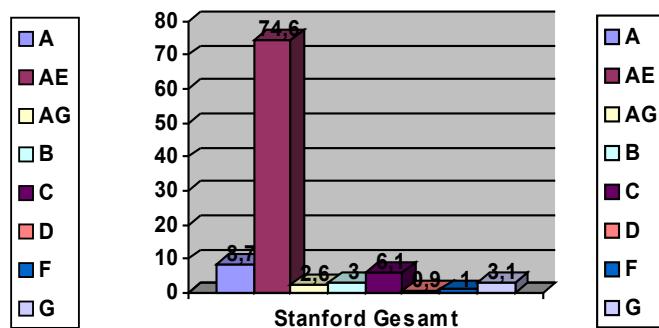


Bild 5b) T39K: Subtypen (Stanford, alle Sequenzen)

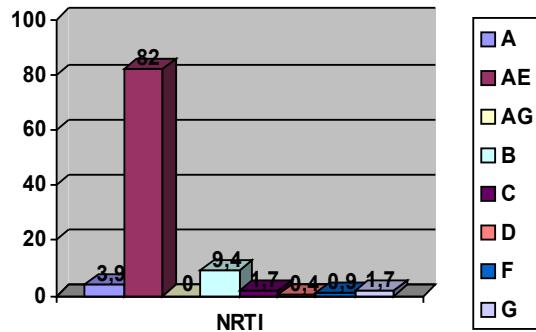
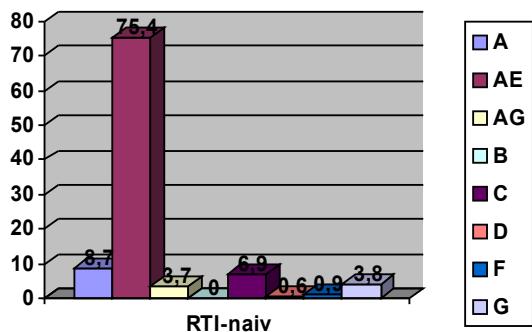


Bild 5c) T39K: Subtypen (Stanford, RTI-naiv) Bild 5d) T39K: Subtypen (Stanford, NRTI-Therapie)

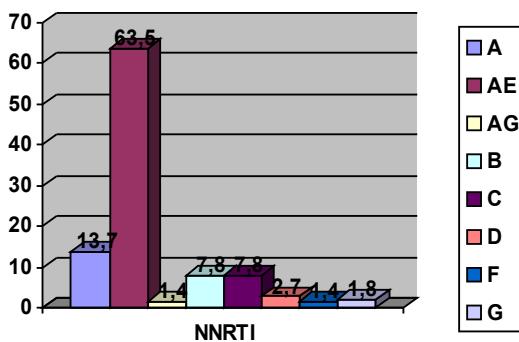


Bild 5e) T39K: Subtypen (Stanford, NNRTI-Therapie)

Die Beobachtung, dass **T39E** gehäuft bei Non-B-Viren vorkommt, ließ sich mit Hilfe der MvP-Datenbank verifizieren: 40 RT-Sequenzen wiesen **T39E** auf, wovon der Anteil an Non-B-Viren überwog ($38/40=95,0\%$) und fast alle den Subtyp C aufwiesen ($37/40 = 92,5\%$). Subtyp B kam mit einer Häufigkeit von 5,0% (2/40) vor, Subtyp F bei einer Sequenz (**Bild 6a**).

Zum Abfragezeitpunkt lagen in der Stanford HIV Drug Resistance Database 2074 Sequenzen mit T39E vor (2074/17289 Sequenzen = 12%), wobei der Anteil von Non-B-Subtypen 98,9% ausmachte (2052 von 2074 Sequenzen; **Bild 6b**). Subtyp B war mit 22 von 2074 Sequenzen vergleichsweise selten vertreten (= 1,1%). Subtyp C dominierte analog zum MvP-Patientenkollektiv ($1966/2052 = 94,8\%$) und machte 95,8% aller Non-B-Sequenzen aus. Subtyp CRF01_AE kam in etwa 3% der Fälle vor ($64/2074$), A (0,4%), D (0,2%) sowie F und G (je ca. 0,1%) deutlich seltener.

Berücksichtigte man die Vortherapie der Patienten, dann fand sich weder in der RTI-naiven noch in der NRTI-behandelten Gruppe eine Sequenz mit Subtyp B. Einzig nach NNRTI-Therapie ließen sich 22 Sequenzen mit Subtyp B nachweisen ($22/522 = 4,2\%$) gegenüber 500 Non-B-Sequenzen (=95,8%). Subtyp C hatte unter den Therapie-naiven Patienten eine Prävalenz von etwa 96% (1283/1335 Isolate) und kam nach Behandlung mit NNRTI etwa gleich häufig, nach NRTI-Therapie

etwas seltener vor (NRTI: 201/217 = 92,6%; NNRTI: 482/500 = 96,4%). Als zweithäufigster Subtyp konnte CRF01_AE bei RTI-naiven und NNRTI-behandelten Patienten ungefähr gleich häufig nachgewiesen werden (RTI-naiv: 12/1335 = 0,9%; NNRTI: 6/500 = 1,2%), mit NRTI etwas häufiger (6/217 = 2,8%). Die Subtypen AG und F erschienen erst nach medikamentöser Therapie. Subtyp D tauchte bei NRTI-Behandlung nicht auf (**Bild 6 c – e**).

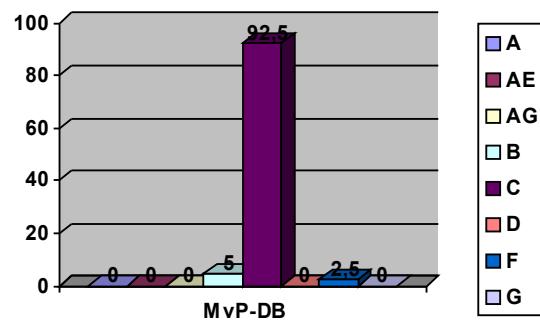


Bild 6a) T39E: Subtypen (MvP; alle Sequenzen)

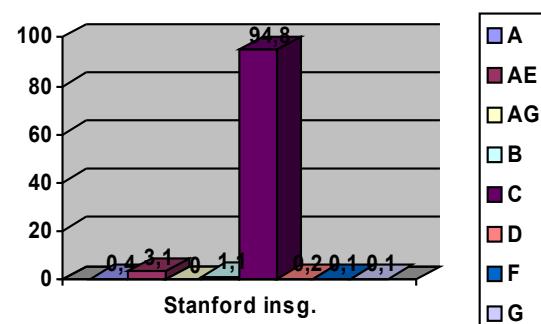


Bild 6b) T39E: Subtypen (Stanford; alle Sequenzen)

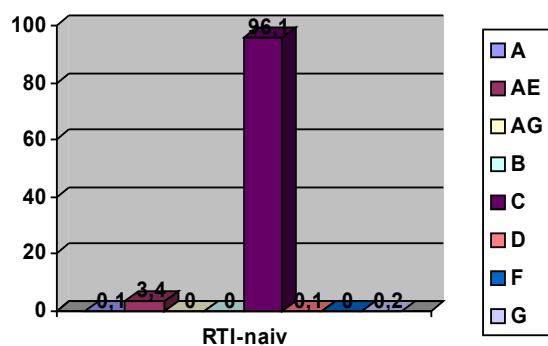


Bild 6c) T39E: Subtypen (Stanford; RTI-naiv)

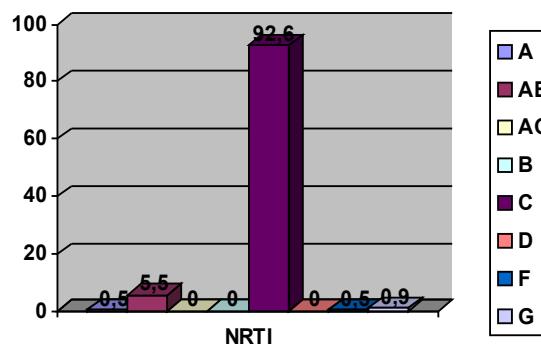


Bild 6d) T39E: Subtypen (Stanford, NRTI-Therapie)

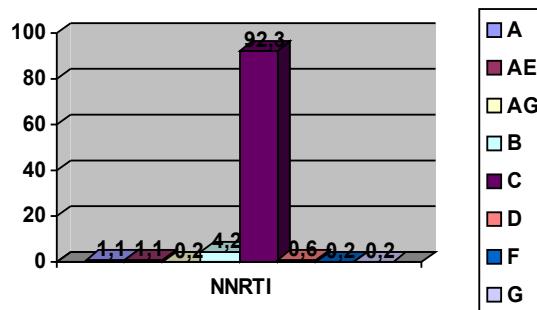


Bild 6e) T39E: Subtypen (Stanford; NNRTI-Therapie)

5. Diskussion

Anhand einiger Beispiele soll das breite Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten der neu geschaffenen MvP-HIV-Datenbank gezeigt werden. Mit Hilfe der Datenbank gelang es beispielsweise, die Häufigkeit einzelner Mutationen und Mutationsmuster bei Virus-Isolaten zu untersuchen. Das relativ große Einzugsgebiet - der Großraum München - und die Größe der Datenbank trugen zu einer repräsentativen Betrachtung der erhobenen Daten bei. Die Ergebnisse der MvP-Datenbank wurden mit denen der heterogeneren und umfangreicheren Stanford University HIV Drug Resistance Database verglichen, um auf mögliche regionale Besonderheiten der Datensätze aufmerksam zu werden. Das Format der Münchener Datenbank bot dabei den Vorteil, die Entwicklung einzelner Mutationen über einen definierten Zeitraum beobachten zu können.

5.1. Prävalenz häufiger Mutationen

In der MvP-Datenbank kam es an manchen RT-Positionen relativ selten zu **NRTI-assoziierten Mutationen**, so an den Codons 65, 75, 115, 151 und 227 (**Tabelle 1a - NRTI-assozierte Mutationen**). An Position 65 lässt sich exemplarisch nachvollziehen, warum die Mutationsfrequenz hier niedrig und die Bandbreite an Mutationen gering ist. Kommt es durch Mutation zu einem Ladungsverlust des positiv geladenen Lysin, welches im Normalfall an der Bindung von Nukleotiden beteiligt ist, so nimmt - außer im Falle von K65R - die Funktionsfähigkeit des Enzyms ab (Garforth 2007). Die Fitness des Wildtyp-Virus ist damit am höchsten; mit Ausnahme von Arginin (K65R) können andere Mutationen dem selektiven Druck nicht standhalten und werden ausselektioniert.

MvP- und Stanford-Datenbank zeigten an vielen RT-Codons ein ähnliches Spektrum an Aminosäuren. Besonders an den Stellen 210, 215 und 219 ließen sich jedoch im Münchener Patientenkollektiv einige von Stanford nicht aufgeführte Varianten nachweisen, beispielsweise L210Y (Frequenz: 0,3%), L210V (0,2%), L210G und L210E (je 0,1%), T215S (0,9%), T215H und T215L (je 0,2%) und schließlich K219G und K219D (0,2%). L210Y wurde als Polymorphismus bei Viren der Subgruppe O beschrieben, eine vermehrte Resistenzneigung konnte jedoch nicht festgestellt werden (Vergne 2000). L210V und G wurden in Zusammenhang mit einer multiresistenten Virusvariante gebracht (Blankson 2005). T215S und H zählt man zu den transitionalen Mutationen, die den Übergang zu einer Resistenzmutation markieren. Oft sind sie ein Zeichen eines hohen Selektionsdrucks durch die antiretroviralen Medikamente und zeigen die Entstehung resistenter Varianten an, z.B. T215Y (Shafer, "Genotype-Phenotype Discordances; Wong

J. 1997). K219G konnte in einer Studie über Thymidin-Analoga-Mutationen und Zidovudin-Resistenz nachgewiesen werden (García-Lerma 2004). Diese seltenen Mutationen kommen in der MvP-Datenbank allerdings kaum vor. Um ihre Rolle zur Resistenz-Entwicklung und mögliche Zusammenhänge mit verschiedenen Subtypen zu erfassen, bedarf es weitergehender Studien.

An einigen Enzym-Positionen traten in der MvP-Datenbank Mutationen häufiger als in der Stanford-Datenbank auf, beispielsweise an den Codons 41 (MvP: 31,9%; Stanford: 16,4%), 44 (MvP: 10,9%; Stanford: 4,5%), 67 (MvP: 30,2%; Stanford: 16,4%), 184 (MvP: 41,5%, Stanford: 21,4%), 210 (MvP: 22,2%, Stanford: 11,0%) und 215 (MvP: 42,6%, Stanford: 22,4%). Fast alle dieser Mutationen gehören zu den Nukleotid-Exzisions-Mutationen und sind mit einer Resistenz gegenüber Zidovudin (AZT) assoziiert. M184V hingegen ist - trotz high-level-Resistenz gegenüber 3TC - verbunden mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber AZT, D4T und TDF (HIV Resistance Web, "Mutation and Drug Data: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors"). Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Patientengruppen in der Stanford-Datenbank kamen diese Mutationen im MvP-Patientenkollektiv ähnlich häufig vor wie in der amerikanischen Gruppe mit NRTI-Vorbehandlung. Dies mag damit zusammen hängen, dass das Münchener Patientengut vor allem aus ebenfalls unter Therapie stehenden HIV-Infizierten besteht und keine Gruppe ohne Vortherapie existiert wie in den US-amerikanischen Daten. Ob ein Grund für die unterschiedlichen Häufigkeiten in beiden Datenbanken auch an anderen Therapieschemata liegt, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Dass gerade die erwähnten AZT-assoziierte Mutationen in den USA seltener auftreten, könnte an der längeren Therapie-Erfahrung und früherem Wechsel des Therapie-Regimes im dortigen Patientengut liegen und im Umkehrschluss auf eine vergleichsweise längere Behandlung mit althergebrachten Substanzen im Münchener Patientenkollektiv deuten. Zur Klärung solcher Fragestellungen wäre eine Ergänzung der MvP-Datenbank um medizinische Informationen wie Art und Dauer der medikamentösen Behandlung sowie Krankheitsverlauf für die Zukunft sinnvoll.

Betrachtet man die **NNRTI-assoziierten Mutationen** (vgl. **Tabelle 1b - NNRTI-assoziierte Mutationen**) innerhalb der Stanford HIV Drug Resistance Database und vergleicht insbesondere die Mutationshäufigkeit bei unbehandelten und vortherapierten Patienten, so ist gut nachzuvollziehen, dass unter dem Selektionsdruck antiretroviraler Pharmaka in einem weitaus größeren Maße Mutationen auftreten. Ausnahmen sind K101R (mit Vortherapie: 1,2%; unbehandelt: 0,8%), K103R (mit Vortherapie: 1,8%; unbehandelt: 1,4%) und V106I (mit Vortherapie: 2,0%; unbehandelt: 1,7%). Genannte Mutationen scheinen also eine häufige Normvariante zu sein; möglicherweise sind sie

sogar mit einem anderen Virus-Subtyp assoziiert. Mutationen an Codon 103 wiesen in entsprechenden Studien unterschiedliche Resistenzmuster auf. So scheint K103H zwar selten zu sein, jedoch die Wirksamkeit aller NNRTI deutlich zu reduzieren (Harrigan 2005). Für V106G wurde zusammen mit G190V eine vermehrte Resistenz gegenüber Efavirenz beschrieben (McColl 2004), Y188F und Y188D wurden mit einer NNRTI-Resistenz in Verbindung gebracht (Elion 2006; Frater 2001; Richman 1994; Sato 2006). Neben medizinischen Informationen wären in diesen Fällen Informationen zum jeweiligen Subtyp ebenfalls eine sinnvolle Ergänzung der MvP-Datenbank und sollten für künftige Analysen einbezogen werden.

Auch bei den NNRTI-assoziierten Mutationen ist in der MvP-Datenbank die Mutationsfrequenz höher als in der Stanford-Datenbank. Möglicherweise sind aufgrund der geringeren Anzahl an Sequenzen im MvP und einer größeren Streuung die Häufigkeitsangaben falsch hoch, so dass die amerikanischen Ergebnisse vielleicht eher die wahren Werte erreichen. Hauptsächlich dürfte aber - wie bei den NRTI - dieser Unterschied dadurch zustande kommen, dass die Stanford-Datenbank einen hohen Anteil an unbehandelten Patienten aufweist; so ist hier die Mutationsrate bei behandelten Patienten höher als im Münchener Patientengut.

Die Codons 100 und 225 weisen in den MvP- wie auch den Stanford-Daten nur ausnahmsweise eine Mutation auf und dann mit einer nur geringen Variabilität. Ähnliches gilt für Codon 230, für das nur wenige Fälle von Mutationen beschrieben sind, die dann aber zu hochgradiger Resistenz führen. Gründe für die niedrige Mutationsfrequenz könnten in einer gewissen genetischen Stabilität liegen, so dass Spontanmutationen weniger häufig auftreten und im Falle einer Mutation die Replikationsfähigkeit des Virus stark vermindert wäre. Unter dem selektiven Druck könnten sich fitttere Viren ohne dieses Mutationsmuster durchsetzen, was die geringe Mutationsfrequenz an diesen Codons erklärt.

Bei der Analyse **PI-assozierter Mutationen** fanden sich in der Stanford-Datenbank einige Sequenzen mit Abweichungen vom Wildtyp-Virus, ohne dass die Patienten mit antiretroviralen Substanzen vorbehandelt gewesen wären. Zudem kamen diese Mutationen in der PI-naiven Patientengruppe häufiger vor als unter PI-Therapie. An diesen Positionen muss deshalb davon ausgegangen werden, dass Virusstämme existieren, für die diese Abweichungen vom Referenzvirus den Normaltyp darstellen. Für H69K wurde beispielsweise in einer Studie mit afrikanischen Virusisolaten gezeigt, dass sich die Struktur der Protease für die Subtypen A, C und B unterscheidet und H69K hauptsächlich bei Viren der Subtypen A und C als natürlicher Polymorphismus vorkam (Velazquez 2001).

Im Gegensatz zu den NNRTI-assoziierten Mutationen, wo sich die Häufigkeiten in den MvP-Datensätzen und in der vorbehandelten Untergruppe der Stanford-Datenbank ähneln, tauchen bei der Protease in den vorliegenden Datensätzen wesentlich seltener Abweichungen vom Wildtyp auf (**Tabelle 2 - PI-assoziierte Mutationen**). Möglicherweise wurden die Patienten der amerikanischen Datenbank vermehrt und länger mit Proteaseinhibitoren behandelt, so dass die Mutationsfrequenz dort größer ist als im MvP-Patientengut. Ein konkreter Vergleich würde auch hier Informationen über die HIV-Therapie erforderlich machen. Daneben wird in Zeiten zunehmender Resistenzbildungen und Bildung neuer Virusstämme deutlich, dass in Bezug auf die Wirksamkeit von Medikamenten und hinsichtlich der immer detaillierteren Algorithmen gängiger Resistenztestungsprogramme die unterschiedlichen Virus-Subtypen zunehmend berücksichtigt werden müssen.

5.2. Sequentielles Auftreten von Mutationen unter antiretroviraler Therapie

Die neu aufgebaute MvP-Datenbank ermöglicht eine einfache Abfrage einzelner Enzympositionen hinsichtlich der zeitlichen Abfolge von Mutationen unter medikamentöser Therapie. Dennoch sind mit den Ergebnissen keine allgemeingültigen Aussagen möglich. Hierzu fehlen Informationen über die Vortherapie der betreffenden Patienten, außerdem stützen sich die Erkenntnisse auf nur wenige Sequenzen im Vergleich zu größeren Datenbanken wie der Los-Alamos- oder Stanford-HIV-Datenbank.

Dennoch lassen sich in der MvP-Datenbank gewisse Beobachtungen zu einem sequentiellen Auftreten von Mutationen unter antiretroviraler Therapie machen. Nach Ersteinsatz von **Tenofovir (TDF)** kann man beispielsweise einen plötzlichen Anstieg in der Häufigkeit der Schlüsselmutation K65R beobachten. Nachdem TDF Anfang des Jahres 2002 zum ersten Mal in Deutschland eingesetzt wurde und K65R im darauf folgenden Jahr eine stark erhöhte Inzidenz zeigt, nämlich 8,51% im Vergleich zu 0,99% im Jahr 2000, ist eine Korrelation zwischen Ersteinsatz des Medikaments Tenofovir und Mutation möglich. Ein ähnlicher Zusammenhang wird in der deutsch-französischen TEDDI-Studie beschrieben, in der Wirksamkeit und Resistenzentwicklung von Tenofovir in Kombination mit Didanosin (ddI) und Lamivudin (Efavirenz) überprüft wurden. 25% der 39 beobachteten Patienten zeigten bereits nach 12 Wochen ein Therapieversagen. K65R wurde hier neben L74V/I und NNRTI-Mutationen als mitverantwortliche Resistenzmutation identifiziert (Van Lunzen 2005). Die anhand der MvP-Datenbank gemachte Beobachtung stützt sich auf nur wenige Sequenzen und ist daher nur begrenzt aussagekräftig. Gleichwohl lassen die bekannte Assoziation von Medikament und Schlüsselmutation und die Aussagen der TEDDI-Studie eine

zeitliche Korrelation plausibel erscheinen.

Für **Zidovudin (AZT)** wird schon lange M41L als Schlüsselmutation beschrieben. Insgesamt ergibt sich in der MvP-Datenbank eine Auftretenswahrscheinlichkeit von 27,3% (150 von 549). Betrachtet man die Entwicklung über die Jahre hinweg, so gibt es keine großen Veränderungen in der Mutationsrate. Aufgrund der hohen Assoziation der Mutation mit AZT liegt die Vermutung nahe, dass die entsprechenden Patienten unter Langzeithandlung mit diesem altbewährten Medikament oder mit Stavudin (d4T) standen. Letzteres wird ebenfalls mit M41L in Verbindung gebracht. Die Abnahme von 36,0% im Jahr 2000 auf 25,7% im Jahr 2001 lässt sich möglicherweise durch den vermehrten Einsatz alternativer antiretroviraler Substanzen in den letzten Jahren erklären. Ähnliches ist für die Veränderung vom Jahr 2003 zu 2004 anzunehmen, in der sich die Prävalenz der Mutation fast halbierte (Jahr 2003: 24,5%; 2004: 13,7%). Diese Entwicklung entspricht einem Trend in den Industrieländern, auf AZT als initiales Medikament der HAART zu verzichten. M41L taucht auch häufig in Kombination mit anderen TAM auf.

Der Protease-Inhibitor **Atazanavir** wird mit I50L als Schlüsselmutation in Verbindung gebracht und wurde ansonsten einzig unter Therapie mit Amprenavir beschrieben (HIV Resistance Web, "Mutation and Drug Data: Protease Inhibitors"). Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Ersteinsatz von Atazanavir und I50L ist angesichts der beschriebenen hohen Assoziation möglich, bei Nachweis einer einzigen Sequenz mit den MvP-Daten allerdings nur bedingt zu objektivieren. In allen drei Beispielen sollten weitere, aktuellere Sequenzen und auch andere Datenbanken herangezogen werden, um den postulierten Zusammenhang mit höheren Fallzahlen zu untermauern.

5.3. Einfluss neu beschriebener HIV-1-RT-Mutationen auf die Resistenz

Im Vergleich der von *Saracino* erhobenen Daten mit der MvP- und der Stanford-Datenbank lassen sich Aussagen über die Prävalenz der erwähnten Mutationen und ihre Assoziation mit antiretroviraler Therapie und Subtyp treffen. Die italienische Forschungsgruppe verglich dabei Sequenzen mit einem Referenz-Virus des Subtyps B, berücksichtigten mögliche natürliche Polymorphismen von Non-B-Subtypen dabei jedoch nicht. In der MvP-Datenbank weisen Sequenzen mit den neu als Resistenz-relevant beschriebenen Mutationen großenteils den Subtyp B auf, allerdings treten beispielsweise D218E, H221Y oder K223EQ mit jeweils etwa 6%, 4% bzw. 3% Prävalenz selten auf. Die klinische Relevanz der 10 Positionen bezüglich Resistenzbildung muss deshalb unterschiedlich beurteilt werden.

Die Mutation **K20R** ist in der MvP-Datenbank bei 15% der Sequenzen vorhanden und kommt vor allem zusammen mit Subtyp B, allerdings auch bei Viren anderen Subtyps vor. Die Stanford-

Datenbank zeigt, dass zwar auch RTI-naive Patienten die Mutation aufweisen, dass die Häufigkeit von K20R aber in der Patientengruppe mit NRTI-Behandlung höher ist. Somit kommt die Mutation relevant häufig vor und eine Assoziation mit HAART scheint nachvollziehbar, was die Daten der italienischen Studie bestätigt. Die fehlende statistische Signifikanz in der multivariaten Studie könnte sich durch eine gehäufte Prävalenz von K20R auch bei Non-B-Subtypen erklären.

Auch **T39A** scheint ausreichend häufig in der MvP-Datenbank vorzukommen (10%). Die entsprechenden Sequenzen zeigen vermehrt Subtyp B, aber in einem Viertel der Fälle auch andere Subtypen, v.a. Subtyp F. Bei Patienten mit antiretroviraler Therapie ist die Zahl an Viren des Subtyps B mehr als doppelt so hoch als ohne Vorbehandlung, Non-B-Subtypen sind dagegen deutlich seltener. Die MvP-Sequenzen weisen die Mutation im Jahr 2004 häufiger auf als im Jahr 2000. Da T39A auch ohne Vorbehandlung und bei Non-B-Viren nachzuweisen ist, ist zwar insgesamt entsprechend den italienischen Ergebnissen eine Assoziation der Mutation mit NRTI-Therapie und Subtyp B anzunehmen; zu einem gewissen Teil scheint T39A aber auch als natürlicher Polymorphismus bei Non-B-Viren vorzukommen.

Die Mutationen **K43EQN** wurden in der italienischen Studie mit Resistenz gegenüber AZT und d4T assoziiert. K43Q und N sind in der MvP-Datenbank vergleichsweise selten (3,8% bzw. 1,7%) und erfüllen damit die Kriterien der italienischen Studie für eine relevante Mutation nicht. K43QN kommt im Münchener Patientenkollektiv gehäuft in Kombination mit Subtyp B vor. In der Stanford-Datenbank kommen die Mutationen in der RTI-naiven Patientengruppe nur bei Viren des Subtyps CRF02_AG vor, wobei sich K43E ungeachtet der Vorbehandlung bevorzugt bei Subtyp CRF01_AE finden lässt, während in der MvP-Datenbank immerhin ein Viertel der Sequenzen CRF02_AG aufweisen gegenüber knapp 70% mit Subtyp B. Die von *Saracino* postulierte Bedeutung von K43EQN für eine NRTI-Resistenz mag zwar gelten, dennoch zeigt die Stanford- und im Falle von K43E auch die MvP-Datenbank eine starke Assoziation mit dem Non-B-Subtyp CRF02_AG, so dass hier ein natürlicher Polymorphismus wahrscheinlich und die Relevanz im Hinblick auf Subtyp-B-assoziierte Arzneimittelresistenzen zweifelhaft ist.

In der MvP-Datenbank kommt **E203K** mit einer Häufigkeit von 6,3% vor. Trotz einem bevorzugten Auftreten von E203KD bei Viren des Subtyps B und einem wahrscheinlichen Zusammenhang mit der antiretroviralen Therapie – E203K ist in der Stanford-Datenbank selten und nur nach NRTI-Therapie nachzuweisen – ist angesichts der geringen Häufigkeit die Relevanz für die Resistenztestung unklar.

Auch **H208Y** ist in der MvP-Datenbank mit knapp 7% nicht häufig anzutreffen. Die Mutation kommt in der Stanford-Datenbank allerdings nur bei behandelten Patienten und fast immer bei

Subtyp B vor; allenfalls Subtyp F scheint in vernachlässigbar kleiner Fallzahl mit der Mutation in Zusammenhang zu stehen. Die postulierte Assoziation von H208Y mit antiretroviraler Therapie scheint also wahrscheinlich.

Mit 6% ist **D218E** in der MvP-Datenbank ebenso selten vertreten; dennoch legen die amerikanischen Daten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Mutation und antiretroviraler Therapie nahe. D218E scheint hier außerdem bevorzugt bei Subtyp B vorzukommen. Daneben lässt sich die Mutation in der Stanford-Datenbank ungeachtet der Vortherapie nur bei Subtyp CRF01_AE nachweisen, in der MvP-Datenbank hingegen auch in etwa 23% der Fälle bei anderen Subtypen. Insgesamt schien also zumindest bei Subtyp B analog der Hypothese der italienischen Forschungsgruppe eine klinische Relevanz von D218E wahrscheinlich. Das Münchener Patientenkollektiv unterscheidet sich an dieser Position von dem der Stanford-Datenbank.

Seit dem Jahr 2007 beschreiben die gängigen Resistenzalgorithmen Mutationen an RT-Codon 101 als Resistenz-relevant, so dass sich hinsichtlich **K101EPQ** die früheren Ergebnisse der Saracino-Arbeitsgruppe bereits bestätigt haben. Für K101E wird eine niedriggradige Resistenz gegenüber allen NNRTI beschrieben, K101P führte in einer Studie aus dem Jahr 2006 zu einer deutlich reduzierten Medikamentenempfindlichkeit (Parkin 2006). In der MvP-Datenbank sind K101Q und P mit einer Häufigkeit von insgesamt 2,9% und 0,2% äußerst selten, K101E kommt mit 4,6% etwas häufiger vor. Alle drei Mutationen sind hauptsächlich mit Subtyp B assoziiert.

RT-Position 221 zeigt in der MvP-Datenbank eine niedrige Mutationsrate, in über 95% der Fälle liegt keine Abweichung vom Wildtyp-Virus vor. Als beinahe einzige Mutation kann **H211Y** nachgewiesen werden, deren Auftretenswahrscheinlichkeit über die Jahre kaum Schwankungen zeigt. In der Stanford-Datenbank kommt die Mutation zwar selten, aber bei Patienten mit NNRTI-Behandlung häufiger vor. Analog zur MvP-Datenbank weisen die H211Y-positiven Sequenzen mehrheitlich Subtyp B auf, allerdings liegt in 26% der Fälle ein Non-B-Subtyp vor. Eine Therapie-Assoziation im Sinne der italienischen Studie kann nachvollzogen werden; da die Mutation insgesamt selten ist und ein nicht unwesentlicher Teil der entsprechenden Sequenzen einen Non-B-Subtyp aufweist, von den wenigen H211Y-positiven Sequenzen also nur ein Teil Subtyp B zeigt, könnten hier natürliche Polymorphismen eine Rolle spielen.

Die Arbeitsgruppe um *Saracino* beschrieb eine Assoziation von **K223EQ** mit einer Resistenz gegenüber Efavirenz (EFV). Insgesamt betrachtet sind Mutationen am RT-Codon 223 sowohl in der MvP- als auch in der Stanford-Datenbank selten, wobei hauptsächlich K223E und Q vorkommen. Beide Datenbanken führen K223EQ fast ausschließlich in Zusammenhang mit Subtyp B auf, so

dass eine Therapie-Assoziation mit NNRTI wahrscheinlich ist. In einer Studie aus dem Jahr 2007 wurde inzwischen für die beiden Mutationen eine starke Assoziation mit NNRTI-Therapieversagen festgestellt (Ceccherini-Silberstein 2007), was trotz seltenem Auftreten von K223EQ die von *Saracino* postulierte Relevanz bezüglich einer Resistenzentwicklung bestätigt.

L228HR kommt in der MvP-Datenbank im Jahr 2004 mit 12,6% Auftretenswahrscheinlichkeit häufiger vor als im Jahr 2000. In der Stanford-Datenbank treten beide Mutationen gehäuft in der Patientengruppe mit NNRTI-Vorbehandlung auf und stehen meist in Verbindung mit Subtyp B, was auch hier die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um *Saracino* zu bestätigen scheint.

5.4. Resistenzpfade

Bei der Forschung über HIV-Resistenzen und die pathophysiologischen und molekularbiologischen Grundlagen ist auch die zeitliche Abfolge von Mutationen von Interesse. Durch eine Art Mutationsstammbaum lassen sich Mutationswege oft bis zur Entwicklung einer Resistenzmutation verfolgen. Dabei wird häufig eine Divergenz beschrieben, so dass entweder der eine oder der andere Pfad eingeschlagen wird mit jeweils typischer Mutationsabfolge. Theoretisch sollte das Virus dann nicht Mutationen verschiedener Mutationswege gleichzeitig aufweisen. Vor diesem Hintergrund wurde als weiteres Anwendungsbeispiel die hochrelevante Gruppe der Thymidin-Analoga-Mutationen untersucht.

Die MvP-Datenbank weist insgesamt nur äußerst wenige Sequenzen auf, bei denen eine typische Divergenz der Mutationspfade vorliegt. Gründe hierfür dürften einerseits die Heterogenität des Münchner Patientenguts sein, zum anderen unterschiedliche, nicht nur auf AZT oder andere Thymidinanaloga beschränkte Therapieschemata, die sich in einem gemischten Mutationsprofil widerspiegeln. Gerade durch die Größe der MvP-Datenbank finden sich dennoch einige Sequenzen, die "klassische" Resistenzpfade zeigen (**Tabelle 7 - Klassischer Resistenzpfad**).

Anhand des Beispiels von Patient 2 sieht man nicht nur die typische Abfolge, sondern auch, dass die Mutationsentwicklung ein äußerst dynamischer, multifaktorieller Prozess ist, bei dem sich ein Virus mit Resistenz-Mutation wieder zum Wildtyp-Virus zurückbilden kann und umgekehrt. Insgesamt zeigen die analysierten Sequenzen der beschriebenen fünf Patienten typische Abfolgen von HIV-Resistenzmutationen. Da die Ast-1- oder Ast-2-Mutationen an räumlich benachbarten Codons auftreten, erklärt sich ein ähnlicher Effekt beider Mutationsabfolgen auf die NRTI-Anbindung an die Reverse Transkriptase (Leitner, "HIV Database Drug Resistance Site Viewer").

Würde ein Virus unter dem Druck einer medikamentösen Therapie einen divergierenden Mutationspfad einschlagen, der keine kompensatorischen Ausweichmutationen zulässt, könnte es in

eine Art replikative Sackgasse manövriert werden, was die Suche nach solchen Resistenzwegen auch aus therapeutischem Aspekt sinnvoll macht. Angesichts von Komplexität der molekularen Wechselwirkungen innerhalb der Virusproteine, hoher Mutationsrate und genetischer Flexibilität von HIV wird sich ein Behandlungsschema, welches diese Aspekte der Resistenzentwicklung berücksichtigt, kaum praktisch umsetzen und etablieren lassen.

5.5. Kombinationen von Mutationen

Mögliche Erklärung für das gehäufte gemeinsame Auftreten mancher Mutationen sind eine direkte Nachbarschaft der betroffenen Codons oder eine räumliche Annäherung innerhalb der dreidimensionalen Enzymstruktur. Manche Mutationen, z.B. die erwähnten Thymidin-Analoga-Mutationen, führen zu Resistenzen gegenüber einzelnen antiretroviroalen Medikamenten oder gegenüber einer ganzen Substanzklasse, so dass deren Wirksamkeit sinkt und die virale Fitness entsprechend zunimmt. Bei manchen Kombinationen potenziert sich das Ausmaß der jeweiligen Wirkungsabschwächung. T215YF beispielsweise verursacht alleine eine 10- bis 16-fache und in Kombination mit M41L eine 64-fache Resistenz (HIV Resistance Web, "Mutation and Drug Data - Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors"). Im Falle des Multinukleosid-Resistenzpfads liegt bei Vorliegen Q151M eine 10- bis 20-fache AZT-Resistenz vor, die in Kombination mit V75I, F77I und F116Y auf das Hundertfache ansteigt. Die Suche nach derartiger Kombinationen von Mutationen bringt deshalb wichtige Erkenntnisse für die Resistenzforschung. Da die MvP-Datenbank zwar die Abfrage von Mutationsmustern ermöglicht, aber einiger Zusatzinformationen entbehrt, ist es sinnvoll, bei der Interpretationen der gewonnenen Daten Informationen der Stanford-Datenbank wie Vorbehandlung, Häufigkeit von Mutationen und Ausmaß der Resistenzen einzubeziehen. Die beschriebenen RT- und Protease-Positionen sollen in diesem Rahmen vor allem als Anwendungsbeispiele für die Datenbank gelten (**Tabelle 8-Mutationskombinationen**).

Bei der Mutation **E203K** macht der Wechsel der elektrischen Ladung von Glutamat zu Lysin eine Rolle in der Resistenzentwicklung nachvollziehbar. Wenn zusätzlich eine Mutation an Position 67 vorliegt, so ist dies in unserer Datenbank fast ausschliesslich **D67N**. Mit 25 von 45 E203K-positiven Sequenzen kommt die Mutation zwar nur in etwas mehr als der Hälfte der Fälle vor (56%), angesichts des sonst eher seltenen Auftretens von E203K scheint eine Assoziation aber möglich. Gleiches gilt für einige TAM: In der MvP-Datenbank kann die Mutation beispielsweise gehäuft in Kombination mit T215Y/F nachgewiesen werden, so dass auch hier eine Korrelation möglich erscheint, wenn auch im Rahmen einer Studie aus dem Jahr 2003 keine explizite positive Korrelation zwischen E203K und T215Y/F festgestellt worden ist (Gonzales, 2003). Für E44D und

K70R ist ein Zusammenhang zwar nicht auszuschließen, angesichts einer eher geringen Häufigkeit ist ihr gemeinsames Auftreten jedoch eher als zufällig anzusehen.

Bezüglich der Kombination aus den RT-Resistenzmutationen **L100I und K103N** kann die in der Literatur beschriebene starke Assoziation anhand der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten nachvollzogen werden; ähnliche Resultate fanden sich auch innerhalb der Stanford-Datenbank (Shafer, "NNRTI Mutation Pattern & Susceptibility").

Die Kombination der Protease-assoziierten Mutationen **H69K und R41K** kommt in der MvP-Datenbank mit etwa 85% Häufigkeit vor, was eine Assoziation plausibel macht. In der Literatur werden beide Mutationen als natürlich vorkommende Polymorphismen bei Subtyp-A- und -C-Viren beschrieben. Dies lässt sich anhand der MvP-Daten zeigen: Bei Vorliegen von H69K und R41K weisen bis auf eine einzige Sequenz mit Subtyp B (=0,5%) alle Protease-Sequenzen einen Non-B-Subtyp auf (=99,5%), darunter hauptsächlich die Subtypen A, C oder die Mischformen CRF01_AE und CRF02_AG.

5.6. Subtypisierung

Angesichts zunehmender Resistenzen und der Ausbildung verschiedener, teilweise neuer Subtypen müssen regionale Unterschiede in den Virusstämmen ebenso wie lokale Häufungen von Resistenzmutationen berücksichtigt werden. Informationen zu den Virus-Subtypen wurden bei Erstellung der MvP-Datenbank noch nicht berücksichtigt, sind aber bei vielen Auswertungen und Anwendungsbeispielen einbezogen (**Bild 5a-e, Bild 6a-e**).

5.6.1. Prävalenz verschiedener Subtypen

Sowohl im MvP- als auch im Stanford-Patientengut lässt sich am häufigsten der Subtyp B nachweisen, gefolgt von Subtyp C. Dessen Prävalenz beträgt in der MvP-Datenbank allerdings 3,9% gegenüber 12,5% innerhalb der Stanford-Sequenzen. Im Münchener Patientenkollektiv liegt A mit ebenfalls 3,9% gleich häufig vor, gefolgt von CRF01_AE (3,5% der Fälle). Die amerikanischen Patienten sind hingegen in ca. 8,2% der Fälle mit Subtyp CRF01_AE und in 5,4% der Fälle mit Subtyp A infiziert. Da in den Haupt-Endemiegebieten allerdings Infektionen mit Subtyp C mit einer Häufigkeit von über 50% vorherrschen und die Infektion mangels optimaler Therapiemöglichkeiten rascher progradient ist als in Nordamerika und Europa, wo Subtyp B dominiert, werden in Zukunft in zunehmenden Maße Behandlungsstrategien nötig sein, die auf Virusstämme mit Subtyp C ausgerichtet bzw. regional angepasst sind .

5.6.2. Spezielle Polymorphismen an RT-Codon 39

Die Abfrage der MvP-Datenbank bestätigt die Beobachtung, dass **T39K** bevorzugt bei Non-B-Viren nachgewiesen werden kann. Bei 35 von 36 entsprechend mutierten Sequenzen liegt nicht Subtyp B vor, ein ähnliches Ergebnis findet sich in der Stanford-Datenbank. Am häufigsten kommt dabei T39K zusammen mit Subtyp CRF01_AE vor (MvP: Ca. 78%; Stanford: 75%). CRF02_AG und G sind bei Therapie-unerfahrenen, Subtyp C hingegen bei NNRTI-behandelten Patienten häufiger. Subtyp B kommt in der RTI-naiven Patientengruppe nicht vor.

Ein ähnliches Ergebnis lässt sich für **T39E** beobachten. 95% aller RT-Sequenzen mit dieser Mutation weisen einen Non-B-Subtyp auf (38/40), davon fast ausschließlich Subtyp-C (37/40 = 92,5%). Auch in der Stanford-Datenbank dominieren in diesem Zusammenhang Subtyp-C-Viren (1966/2074 Sequenzen = 94,8%), in über 98,9% der Fälle liegt nicht Subtyp B vor (2052/2074 Sequenzen).

Zusammengefasst muss also davon ausgegangen werden, dass am RT-Codon 39 bei Nachweis der Aminosäuren Lysin oder Glutamat diese Abweichung vom Wildtyp-Virus einen Polymorphismus eines von B verschiedenen Subtyps darstellt und keine Resistenz im klassischen Sinne vorliegt. Außerdem zeigt sich einmal mehr die Relevanz von Informationen über den Virus-Subtyp. Eine künftige Erweiterung der MvP-Datenbank um die Subtypen würde das Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten deshalb sinnvoll ergänzen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine HIV-Sequenz-Datenbank programmiert. Sie enthält 1326 Reverse-Transkriptase- und 1286 Protease-Sequenzen, die von Januar 2000 bis Oktober 2004 im Max von Pettenkofer-Institut (MvP) getestet wurden. Mit Hilfe eines neu entwickelten Translations-Programms konnten auch an nicht eindeutig definierten Codons alle Kombinationsmöglichkeiten berücksichtigt werden. Die neu entstandene Datenbank erlaubt eine Vielzahl an Abfragen, wovon einige im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden.

Vergleicht man beispielsweise die **Prävalenz häufiger Resistenz-Mutationen** innerhalb der MvP-Datenbank mit den Daten der Stanford HIV Drug Resistance Database, so ist im Münchener Patientengut für die **Reverse Transkriptase (RT)** die Mutationsrate allgemein höher. Nimmt man innerhalb der Stanford-Datenbank nur die Patientengruppe mit antiretroviraler Behandlung als Grundlage, so ist die Prävalenz NRTI-assozierter Mutationen in beiden Datenbanken ähnlich. Ein hoher Anteil entsprechend therapierte Patienten ist deshalb für die MvP-Datenbank anzunehmen.

Die MvP-**Protease-Sequenzen** zeigen insgesamt eine niedrigere Mutationsrate als die der Stanford-Datenbank.

Unter dem selektiven Druck antiretroviraler Medikamente kann ein **sequentielles Auftreten von Mutationen** beobachtet werden. So nimmt in der MvP-Datenbank nach dem deutschen Ersteinsatz von **Tenofovir** (TDF) im Jahr 2002 die Häufigkeit der TDF-assoziierten Mutation **K65R** von 0,99% auf 8,51% zu; eine Assoziation wird durch ähnliche Resultate im Rahmen der europäischen TEDDI-Studie bestätigt. Die seltene Mutation **I50L**, die als Schlüsselmutation des im März 2004 in Deutschland zugelassenen Protease-Inhibitors **Atazanavir** gilt, findet sich in der MvP-Datenbank erstmals im Oktober 2004. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen Neueinführung eines Medikaments und der Schlüsselmutation wahrscheinlich.

Mit Hilfe der Münchener Datenbank konnten außerdem an 10 RT-Positionen Abweichungen vom Wildtyp überprüft werden, die in einer im Jahr 2006 veröffentlichten Studie (Saracino 2006) als **neue Resistenz-relevante Mutationen** eingestuft worden waren (NRTI-assoziiert: K20R, T39A, K43EQN, E203KD, H208Y und D218E; NNRTI-assoziiert: K101EQP, H221Y, K223EQ und L228HR). Im Vergleich mit der MvP- und Stanford-Datenbank lassen sich die Ergebnisse großenteils nachvollziehen, jedoch muss in einigen Fällen von einem nicht unwesentlichen Anteil natürlicher Polymorphismen ausgegangen werden. So sind K43EQN in MvP- und Stanford-Datenbank gehäuft mit Subtyp CRF01_AE bzw. CRF02_AG vergesellschaftet, auch T39A, D218E und H211Y kommen häufig bei Non-B-Viren vor.

Bei der Entwicklung von Resistzenzen gegenüber RTI scheinen **Mutationspfade** eine Rolle zu spielen. Anhand der MvP-Datenbank wurden zwei Mutations-„Äste“ des sog. klassischen Resistenzpfads untersucht, der als wichtiger Faktor bei der Entstehung von Thymidin-Analoga-Mutationen (TAM) gilt. Eine strikte Divergenz des Mutationspfads in zwei Äste kommt in der Datenbank nur vereinzelt vor. Die typische Abfolge von Mutationen (Ast 1: T215FY, M41L, L210W, E44D und V118I; Ast 2: K70R, K219EQ, D67N und T69 DN) lässt sich anhand einiger Patienten demonstrieren, in deren Sequenzen sich entweder Ast-1- oder Ast-2-Mutationen finden. Teilweise können auch Übergangsformen beobachtet werden.

Bestimmte **Kombinationen von Mutationen** treten gehäuft miteinander auf, wodurch sich die Resistenzrate der Einzelmutationen gegenseitig potenziert. In der MvP-Datenbank tritt beispielsweise die seltene RT-Mutation L100I (Häufigkeit: 2,6%) in über 95% der Fälle zusammen mit K103N auf, was eine Assoziation sehr wahrscheinlich macht. Bei Nachweis der RT-Mutation E203K (Häufigkeit: 5,7%) findet sich außerdem bei 56% der entsprechenden Sequenzen auch D67N, in 82% der Fälle liegen Mutationen an Codon 215 vor. Über 85% der Protease-Sequenzen

mit H69K weisen gleichzeitig R41K auf, es besteht hier eine starke Assoziation mit den Subtypen A und C.

Die verschiedenen **Subtypen** und Mischformen des Virus stellen eine große Herausforderung hinsichtlich HIV-Therapie und Resistenztestung dar. In der MvP- und Stanford-Datenbank finden sich hauptsächlich Sequenzen des Subtyps B (Häufigkeit: 79% bzw. 60%), der weltweit am meisten verbreitete Subtyp C kommt deutlich seltener vor (4% bzw. 12,5%). Anhand beider Datenbanken lässt sich zeigen, dass die RT-Mutationen **T39K** bzw. **T39E** fast ausschließlich mit einem **Non-B-Subtyp** assoziiert sind. T39K kommt vornehmlich bei Subtyp CRF01_AE (78%), T39E bei Subtyp C (92,5%) vor. Beide Mutationen müssen also als natürliche Polymorphismen bei Non-B-Viren gedeutet und als solche in modernen Resistenzalgorithmen berücksichtigt werden.

Mit den genannten Beispielen sollen die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der neu etablierten HIV-Sequenzdatenbank gezeigt werden. Wünschenswert wäre eine künftige Erweiterung um Subtypen und medizinische Informationen wie Viruslast, CD4-Zahl und Medikation. Idealerweise sollten auch Virussequenzen aus anderen Jahren sowie weitere Therapie-relevante Abschnitte des viralen Genoms einbezogen werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

3TC:	Lamivudin
ABC:	Abacavir
ANRS:	Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales
APV:	Amprenavir
AZT:	Zidovudin
CRF:	Circulating Recombinant Forms (= zirkulierende rekombinante Formen)
d4T:	Stavudin
DAIG:	Deutsche AIDS Gesellschaft
d. F.:	Der Fälle
ddC:	Zalcitabin
ddI:	Didanosin
ddNTP:	Didesoxynukleotidtriphosphate
DLV:	Delavirdin
dNTP:	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
EBI:	European Bioinformatics Institute
EFV:	Efavirenz
FPV:	Fosamprenavir
FTC:	Emtricitabin
HAART:	Hochaktive, antiretrovirale Therapie
HIV:	Human Immunodeficiency Virus (= HI-Virus)
HR:	Heptad-repeat-Domänen
IDV:	Indinavir
IUB:	International Union of Biochemistry
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
LPV:	Lopinavir
Mut.:	Mutationshäufigkeit
MvP:	Max von Pettenkofer-Institut
NAM:	Nukleosidanalog-Mutationen
N Engl J Med:	The New England Journal of Medicine
NFV:	Nelfinavir
NRTI:	Nukleosidischer Reverser Transkriptase Inhibitor

NNRTI:	Nicht-nukleosidischer Reverser Transkriptase Inhibitor
NVP:	Nevirapin
PCR:	Polymerase-Chain-Reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
PNAS:	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
PR:	Protease
PRI:	Protease-Inhibitor
RKI:	Robert-Koch-Institut
RT:	Reverse Transkriptase
RTI:	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
RTV:	Ritonavir
SQV:	Saquinavir
TAM:	Thymidin-Analoga-Mutationen
TDF:	Tenofovir
WHO:	World Health Organisation
WT:	Wildtyp

Positionen innerhalb der Aminosäure-Sequenz von RT oder PR werden wie folgt abgekürzt:

1. Der 1. Buchstabe steht für die Aminosäure des Wildtyps;
2. Die Zahl zeigt das betreffende Codon an;
3. Der Buchstabe nach der Zahl steht für die tatsächlich vorliegende(n) Aminosäure(n);
4. Kommen mehrere Mutationen an einem Codon in Frage, folgen auf die Codon-Position die IUPAC-Bezeichnungen dafür.

Beispiel: K223EQ bedeutet, dass "K" (Lysin) an Position 223 als Wildtyp vorliegt und dass "E" (Glutamat) und "Q" (Glutamin) die Mutationen an diesem Codon darstellen.

8. Quellenverzeichnis

AIDSinfo:

- Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents - January 29, 2008", Abfrage am 23.06.2008,
<http://aidsinfo.nih.gov/Guidelines>
- "AIDSinfo Drug Database", Arzneimittelinformationen, Abfrage am 13.11.2007,
<http://aidsinfo.nih.gov/DrugsNew>

Altmann A., Beerewinkel N., Buech J. et al., "geno2pheno", Abfragen am 23.01. und 22.08.2007, <http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl> (aktuelle Version: GENAFOR, www.genafor.org; Modul verfügbar unter <http://www.geno2pheno.org>; Stand: 25.08.2009)

ANRS AC 11 Resistance group, "HIV-1 genotypic drug resistance interpretations algorithm", Abfrage am 23.01.2007, <http://www.hivfrenchresistance.org/tab2006.html>; für die Auswertungen wurde Version 13, Juli 2005, verwendet [<http://www.hivfrenchresistance.org/tab2005.html>]

Antiviral Drugs Advisory Committee "Antiviral Drugs Advisory Committee Briefing Document", 24. April 2007, Abfrage am 29.04.2007, <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/briefing/2007-4283b1-01-Pfizer.pdf>

Aschoff K., "Neue HIV-Therapie zugelassen: Prezista (Darunavir) zeigt signifikante Überlegenheit", Pressemitteilung der Pharmafirma "tibotec", 20.02.2007, Abfrage am 13.11.2007, http://www.daignet.de/media/Zulassung_Prezista.pdf

Bächi T., "HIV.ch", Abfrage am 21.11.2007, "www.hiv.ch"

Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F. et al., "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS", **Science** 1983, 220, S. 868-871

Bartmeyer B., Ghassim P., Hamouda O., Kuecherer C., HIV-Serokonverterstudie am Robert Koch-Institut, Homepage des Robert-Koch-Instituts (Stand: 26.03.2007), Abfrage am 10.06.2007, www.rki.de/cln_049/nn_195956/DE/Content/InfAZ/H/HIV/AIDS/Epidemiologie/Surveillance/SeroKon/SeroKon_node.html?nnn=true

Beerewinkel N., Däumer M., Sing T. et al., "Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance", **Journal of Infectious Diseases**, 1. Juni 2005, 191 (11), S. 1953-1960

Blair W., Cao J. et al., "Identification and Characterization of UK-201844, a Novel Inhibitor That Interferes with Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp160 Processing", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Oktober 2007, Vol. 51, No. 10, S. 3554-3561

Blankson J., "Report from Boston: the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). The New York City patient: a case of progression, pathogenesis, and public health", **The Hopkins HIV Report**, The Johns Hopkins University AIDS Service, März 2005, 17 (12), S. 10-11

Bleiber G., Munoz M., Ciuffi A. et al., "Individual contributions of mutant protease and reverse transcriptase to viral infectivity, replication, and protein maturation of antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1", **Journal of Virology**, April 2001, 75 (7), S. 3291-3300

Bouchard M., Masquelier B., Moreno M. et al., "HIV type 1 drug resistance among naive patients from Venezuela", **AIDS Research and Human Retroviruses**, März 2007, 23 (3), S. 482-485

Boucher C.A., O'Sullivan E., Mulder J.W. et al., "Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects", **The Journal of Infectious Diseases**, Januar 1992, 165 (1), S. 105-110

Brenner B., Wainberg M.A., Salomon H. et al., "Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV-1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study", **International Journal of Antimicrobial Agents**, Dezember 2000, 16 (4), S. 429-434

Burke D.S., "Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy", **Emerging infectious diseases**, Juli - September 1997, 3 (3), S. 253-25

Calmy A., Pascual F., Ford N., "HIV Drug Resistance", **N Engl J Med**, 350 (26), 24. Juni 2004, S. 2720-2721

Ceccherini-Silberstein F., Svicher V., Sing T. et al., "Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors", **Journal of Virology**, October 2007, 81 (20), S. 11507-11519

Centers of Disease Control (CDC):

- "A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California", **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, 18. Juni 1982, 31 (23), S. 305-307 und
- "Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-United States", **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 24. September 1982, 31 (37), S. 507-508 sowie S. 513-514

Chen Z., Li Y. et al., "Crystal structure at 1.9-A resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases", **Journal of Biological Chemistry**, 21. Oktober 1994, 269 (42), S. 26344-26348

Clavel F. et al., "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS", **Science**, 18. Juli 1986, 233 (4761), S. 343-346

Clavel F., Hance A.J., "HIV Drug Resistance", **N Engl J Med**, 4. März 2004, 350 (10), S. 1023-1035

Connor R.I., Sheridan K.E., Ceradini D. et al., "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals", **The Journal of Experimental Medicine**, 17. Februar 1997, 185 (4), S. 621-628

Descamps D., Apetrei C. et al., "Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors", **AIDS**, 18. Juni 1998, 12 (9), S. 1109-1111

Deeks S.G., Wrin T., Liegler T. et al., "Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia", **N Engl J Med**, 15. Februar 2001, 344 (7), S. 472-480

Deutsche AIDS-Gesellschaft, "Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviroalen Therapie der HIV-Infektion (Stand September 2008)", Abfrage am 05.02.2009, <http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1/Leitlinien%20zur%20ART%20im%20Erwachsenenalter.pdf>

Deutsche AIDS-Hilfe e.V., Schafberger A. (Hrsg.), "Neue Substanzen in der Entwicklung - Bericht von der 13. Konferenz über Retroviren und Opportunistische Infektionen (CROI), 5. - 8. Februar 2006, Denver, Colorado (Teil 3)", **HIV-Report**, 1. Juli 2006, Ausgabe 04/2006, Abfrage am 16.04.2008, http://www.hivreport.de/media/de/2006_07_HIVReport.pdf

Drake J.W., "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, 1. Mai 1993, 90 (9), S. 4171-4175

Drake J.W., Holland J.J., "Mutation rates among RNA viruses", **PNAS**, 23. November 1999, 96 (24), S. 13910-13913

Elion R., Ha B., DeJesus E. et al., "Selection of HIV Reverse Transcriptase (RT) Thymidine Analogue Mutations (TAMS) Rather than K65R is the Preferred Route of Resistance Seen in Patients with Virologic Failure on Once-Daily (QD) Trizivir (TZV) and Tenofovir (TDF)", Poster Nr. H-1068, **The 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, 16.-19. Dezember 2005, Washington DC (Abfrage am 09.11.2007 unter http://www.hivandhepatitis.com/2005icr/icaac/pdf/GSK002-636_ICAAC_Poster%209_Ross%20et%20al_v%205FINAL.pdf)

European Bioinformatics Institute (EBI):

- Programmpaket "European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)", Programm "EMBOSS transeq", Abfrage am 23.08.2007, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq>
- Programmpaket "European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)", Programm "EMBOSS seqret", Abfrage am 24.08.2007, <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/seqret>
- Programmpaket "European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)", Programm "EMBOSS align needle", Abfrage am 24.08.2007, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align>

European Medicines Agency, "Celsentri - European Public Assessment Report", Oktober 2007, Abfrage am 04.04.2008, <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/celsentri/celsentri.htm>

Fätkenheuer G., Pozniak A.L., Johnson M.A. et al., "Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1", **Nature Medicine**, November 2005, 11 (11), S. 1170-1172

FDA, "Intelence Prescribing Information", Januar 2008, Abfrage am 04.04.2008, <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2008/022187lbl.pdf>

Flepp M., "hiv.ch", Abfrage am 15.04.2008, <http://www.hiv.ch/rubriken/therapie/the.htm>

Frater A.J., Beardall A., Ariyoshi K. et al., "Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients", **AIDS**, 17. August 2001, 15 (12), S. 1493-1502

Gallant J.E., DeJesus E., Arribas J.R. et al., "Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV", **N Engl J Med**, 19. Januar 2006, 354 (3), S. 251-60

García-Lerma J., MacInnes H., Bennet D. et al., "Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1 Carrying the D67N or K219Q/E Mutation Evolves Rapidly to Zidovudine Resistance In Vitro and Shows a High Replicative Fitness in the Presence of Zidovudine", **Journal of Virology**, Juli 2004, 78 (14), S. 7545-7552

Garforth S., Kim T.W., Parniak M.A. et al., "Site-directed mutagenesis in the fingers subdomain of HIV-1 reverse transcriptase reveals a specific role for the beta3-beta4 hairpin loop in dNTP selection", **Journal of Molecular Biology**, 5. Januar 2007, 365 (1), S. 38-49

Gonzalez L.M., Brindeiro R.M., Aguiar R.S., "Impact of Nelfinavir-resistance mutations on the Human Immunodeficiency Virus type 1 with subtype B and C proteases", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, September 2004, 48 (9), S. 3552–3555

Gonzales M.J., Wu T.D., Taylor J. et al., "Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors", **AIDS**, 11. April 2003, 17 (6), S. 791-799

Gulick R.M., "New antiretroviral drugs", **Clinical Microbiology and Infection**, März 2003, 9 (3) , S. 186–193

Gulick R.M., Su Z. et al., "ACTG 5211: phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc in HIV-infected treatment-experienced subjects", Abstract ThLB0217, **XVI International AIDS Conference**, Toronto 2006, Abfrage am 15.04.2008, <http://www.aegis.com/conferences/iac/2006/ThLB0217.html>

Hammer S.M., Saag M.S., Schechter M. et al., "Treatment for Adult HIV Infection 2006 : Recommendations of the International AIDS Society–USA Panel", **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, 16. August 2006, 296 (7), S. 827-843

Hanna G., Lalezari J., Hellinger J. et al., "Antiviral Activity, Safety, and Tolerability of a Novel, Oral Small-molecule HIV-1 Attachment Inhibitor, BMS-488043, in HIV-1-infected Subjects", Abstract 141, **11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, 2004, San Francisco, Abfrage am 15.04.2008, <http://www.retroconference.org/2004/cd/Abstract/141.htm>

Hardman J. et al., "Goodman & Gilman - Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie (Deutsche Übersetzung der 9. Auflage)", Frankfurt am Main, McGraw-Hill, 1998, Band 2, S. 1223 – 1237

Harrigan P.R., Mo T., Wynhoven B. et al., „Rare mutations at codon 103 of HIV-1 reverse transcriptase can confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors“, **AIDS**, 8. April 2005, 19 (6), S. 549-554

Hirsch M.S., Brun-Vézinet F., D'Aquila R.T. et al., "Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel", **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, 10. Mai 2000, 283 (18), S. 2417-2426 und

Hirsch M.S., Günthard H.F., Schapiro J.M. et al., "Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel", **Clinical Infectious Diseases**, 15. Juli 2008, 47 (2), S. 266-285

HIV GRADE e.V., HIV GRADE e.V. Algorithm Homepage, Abfragen am 26.11.2007 und 23.06.2008, <http://www.hiv-grade.de/cms/grade/homepage.html>

HIV Resistance Web:

- "Mutation and Drug Data: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors", Abfrage am 26.11. und 21.12.07, <http://www.hivresistanceweb.com/protected/mutationtables/nrti.shtml>
- "Mutation and Drug Data: Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors", Abfrage am 21.12.2007, <http://www.hivresistanceweb.com/protected/mutationtables/nnrti.shtml>
- "Mutation and Drug Data: Protease Inhibitors", Abfrage am 21.12.07, <http://www.hivresistanceweb.com/protected/mutationtables/pi.shtml>

Hoffmann C., "Isentress (Raltegravir) in der EU zugelassen - eine Übersicht", 15. Januar 2008, Abfrage am 04.04.2008, <http://hiv.net/index.htm>

Hoffmann C., Rockstroh J., Kamps S. et al., "HIV.net 2007", Abfrage am 26.06.2008, www.hiv.net (englische Version verfügbar unter <http://www.hivmedicine.com>; Stand: 25.08.2009)

Hoffman P. E., "Perl 5 für Dummies. Gegen den täglichen Frust mit Perl", mitp Verlag, Oktober 2002

Holquín A. , Paxinos E., Hertogs K. et al., "Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes", **Journal of Clinical Virology**, November 2004, 31 (3), S. 215-220; Patientenisolat am 08.11.2007 abgerufen unter <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/Reference.cgi?RefID=1155&Gene=PR&Type=Clinical>

Hooker D.J., Tachedjian G., Solomon A.E. et al., "An in vivo mutation from leucine to tryptophan at position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine", **Journal of Virology**, November 1996, 70 (11), S. 8010-8018

IUPAC/IUB - International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), "Nomenclature and Symbolism for Amino-Acids and Peptides (Recommendations 1983)", Abfrage am 22.08.2007, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>

Johnson V.A., Brun-Vézinet F. et al.:

- "Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2005", **Topics in HIV Medicine**, Oktober - November 2005, 13 (4), S. 125-131
- "Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2007", **Topics in HIV Medicine**, August-September 2007, 15 (4), S. 119-125
- "Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2008", **Topics in HIV Medicine**, December 2008, 16 (5), S. 138-145

Kasper D., Braunwald E., Fauci A. et al., "Harrison's Principles of Internal Medicine - 16th edition", 2005, McGraw-Hill, New York, S. 1075-1139

Katholieke Universiteit Leuven, Department of Microbiology and Immunology, The **Rega 6.4.1 Algorithm** (01 March 2006), http://www.kuleuven.ac.be/rega/cev/links/rega_algorithm/index.htm (Stand 23.01.2007); aktuelle Version unter <http://www.reg.a.kuleuven.be/cev/>

Kellam P., Boucher C.A., Larder B.A., "Fifth Mutation in human immunodeficiency Virus Reverse transcriptase contributes to the development of high-Level resistance to zidovudine", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** (PNAS), 1. März 1992, 89(5), S. 1934-1938

Kuiken C., Leitner T., Foley B. et al., "HIV Sequence Compendium 2008", Abfrage am 26.06.2008, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/compendium.html>

Larder B.A., Kemp S.D., "Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level-resistance to zidovudine (AZT)", **Science**, 1. Dezember 1989; 246 (4934), S. 1155-1158

Lataillade M., Kozal M.J., "The hunt for HIV-1 integrase inhibitors", AIDS Patient Care and STDs, 1. Juli 2006, 20 (7), S. 489-501

Lazzarin A., Clotet B., Cooper D. et al., "Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia", **N Engl J Med**, 29. Mai 2003, 348 (22), S. 2186-2195

Leitner T., Korber B. et al., Los Alamos National Laboratory:

- "HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences", letztes Update am 4. Juni 2008, Abfrage am 16.04.2008, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- "Sequence Database - Tools - LOCATE - HIV Sequence locator tool", Abfrage am 23.06.2008, <http://www.hiv.lanl.gov/content.html>
- "Sequence Database - Tools - ADRA - ADRA: Antiviral Drug Resistance Analysis", Abfrage am 23.06.2008, <http://www.hiv.lanl.gov/content.html>
- "Sequence Database - Tools - Translate", Abfrage am 23.06.2008, <http://www.hiv.lanl.gov/content.html>
- Dreidimensionale Darstellung unter Verwendung des Programms "HIV Database Drug Resistance Site Viewer", "Sequence Database - Tools - RASVIEW", Los Alamos National Laboratory, Abfrage am 26.11.2007, <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/RASVIEW/RASVIEW.html>
(das Programm wurde mittlerweile von der Homepage entfernt und steht nicht mehr zur Verfügung)

Li F., Goila-Gaur R. et al., "PA-457: A potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, 11. November 2003, 100 (23), S. 13555-13560

Little S.J., Holte S., Routy J.P. et al., "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV", **N Engl J Med**, 8. August 2002, 347 (6), S. 385-394

Liu S.L., Schacker T., Musey L. et al., "Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: HIV type 1 evolution and antiviral responses", **Journal of Virology**, Juni 1997, 71 (6), S. 4284-4295

Lode H. (Hrsg.), Zeitschrift für Chemotherapie:

- "Darunavir - ein weiterer Protease-Inhibitor zur antiretroviralen Therapie", Heft 2 (2007), Abfrage am 13.11.2007,
<http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/darunavir.html>
- Abfrage am 13.11.2007, http://www.zct-berlin.de/tabellen/virust_retro.html
- „Atazanavir - ein neuer Proteaseinhibitor zur einmal täglichen Gabe“, Abfrage am 27.06.2008, <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/atazanavir.html>

Loemba H., Brenner B., Parniak M.A. et al., "Co-receptor usage and HIV-1 intra-clade C polymorphisms in the protease and reverse transcriptase genes of HIV-1 isolates from Ethiopia and Botswana", **Antiviral Therapy**, Juni 2002, 7(2), S.141 - 148

Mayer H. et al., "Safety and efficacy of maraviroc, a novel CCR5 antagonist, when used in combination with optimized background therapy for the treatment of antiretroviral-experienced subjects infected with dual/mixed-tropic HIV-1: 24-week results of a phase 2b exploratory trial", Abstract ThLB0215, **XVI International AIDS Conference**, Toronto 2006, Abfrage am 15.04.2008, <http://www.aegis.org/conferences/iac/2006/ThLB0215.html>

Martin D. E., Salzwedel K., Allaway G. P., "Bevirimat: a novel maturation inhibitor for the treatment of HIV-1 infection", **Antiviral chemistry & chemotherapy**, 2008, 19 (3), S. 107-113

McColl D.J., Margot N.A., Wulfsohn M. et al., „Patterns of resistance emerging in HIV-1 from antiretroviral-experienced patients undergoing intensification therapy with tenofovir disoproxil fumarate“, **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 1. November 2004, 37 (3), S. 1340-50

Menzo S., Castagna A., Monachetti A. et al., "Resistance and replicative capacity of HIV-1 strains selected in vivo by long-term enfuvirtide treatment", **The New Microbiologia**, April 2004, 27 (2 Suppl 1), S. 51-61

Mosley M., Smith-Burchell C. et al., "Resistance to the CCR5 Antagonist Maraviroc Is Characterised by Dose-Response Curves that Display a Reduction in Maximal Inhibition", Abstract 598, **13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Denver 2006, Abfrage am 15.04.2008, <http://www.retroconference.org/2006/Abstracts/27341.htm>

Murga J.D., Franti M., Pevear D.C. et al., "Potent Antiviral Synergy between Monoclonal Antibody and Small-Molecule CCR5 Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Oktober 2006, 50 (10), S. 3289-3296

MySQL AB Firmen-Homepage, "Die wichtigsten Argumente für den Einsatz von MySQL", Abfrage am 23.06.2008, <http://www.mysql.de/why-mysql/topreasons.html>

National Center for Biotechnology Information, "FASTA format description", Abfrage am 22.08.2007, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/fasta.shtml>

Norris D., Morales J., Gathe J. et al., "Phase 2 efficacy and safety of the novel entry inhibitor, TNX-355, in combination with optimized background regimen (OBR)", Abstract no. TUPE0058, **XVI International AIDS Conference**, Toronto 2006, Abfrage am 15.04.2008, <http://www.iasociety.org/Default.aspx?pageId=11&abstractId=2195524>

Obermeier M.:

- Einleseformular für Nukleinsäuresequenzen, 2003
- Programm "getlistv2", 2003

O'Loughlin T., Greene D.N., Matsumura I., "Diversification and Specialization of HIV Protease Function During In Vitro Evolution", **Molecular Biology and Evolution**, April 2006, 23(4), S. 764-772

Palella F.J., Delaney K.M. et al., "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection", **N Engl J Med**, 26. März 1998, 338 (13), S. 853-860

Palmer S., Alaeus A. et al., "Drug susceptibility of subtypes A,B,C,D, and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates", **AIDS Research and Human Retroviruses**, 20. Januar 1998, 14 (2), S. 157-62

Parera M., Fernàndez G. et al., "HIV-1 protease catalytic efficiency effects caused by random single amino acid substitutions", **Molecular Biology and Evolution**, Februar 2007, 24 (2), S. 382-287

Parkin T., Gupta S. et al., "The K101P and K103R/V179D Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confer Resistance to Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Januar 2006, 50 (1), S. 351-354

Perelson A.S., Neumann A.U., Markovitz M. et al., „HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time”, **Science**, 15. März 1996, 271 (5255), S. 1582-1586

PHP Firmen-Homepage, "Was kann php?", Abfrage am 23.08.2007, <http://ch2.php.net/manual/de/intro-whatcando.php>

Pieniazek D., Rayfield M., Hu D.J. et al., "HIV-2 protease sequences of subtypes A and B harbor multiple mutations associated with protease inhibitor resistance in HIV-1", **AIDS**, 20. Februar 2004, S. 492-502; Sequenz einsehbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&val=33860070> [Abfrage am 28.10.2007]

Poppe S. M., Slade D. E. et al., "Antiviral activity of the dihydropyrrone PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Mai 1997, 41 (5), S. 1058-1063

Reese G., "MySQL kurz und gut", O'Reilly Verlag, 1. Auflage, August 2003

Richman D.D., Havlir D., Corbeil J. et al., "Nevirapine Resistance Mutations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selected during Therapy", **Journal of Virology**, März 1994, 68 (3), S. 1660-1666

Robert-Koch-Institut, www.rki.de:

- "HIV/AIDS in Deutschland - Eckdaten - Epidemiologische Kurzinformation des Robert-Koch-Instituts (Stand: Ende 2008)" , Abfrage am 04.02.2009, http://www.rki.de/cln_100/nn_195960/DE/Content/InfAZ/H/HIV/AIDS/Epidemiologie/Daten_und_Berichte/EckdatenDeutschland,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EckdatenDeutschland.pdf
- "HIV/AIDS in Bayern - Eckdaten - Epidemiologische Kurzinformation des Robert-Koch-Instituts (Stand: Ende 2008)" , Abfrage am 04.02.2009, http://www.rki.de/cln_100/nn_195960/DE/Content/InfAZ/H/HIV/AIDS/Epidemiologie/Daten_und_Berichte/EckdatenBayern,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EckdatenBayern.pdf
- "HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland – Aktuelle epidemiologische Daten (Stand vom 31.12.2004)", Sonderausgabe A/2005, Abfrage vom 29.03.2009, http://www.rki.de/cln_100/nn_208946/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2005/Sonderausgaben/A_2005,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/A_2005.pdf

Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A., "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1", **Science**, 25. November 1988, 242 (4882), S. 1171-1173

Romano L., Venturi G., Bloor S. et al., "Broad nucleoside-analogue resistance implications for human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase mutations at codons 44 and 118", **Journal of Infectious Diseases**, 1. April 2002, 185 (7), S. 898-904

Ross L., Lim M., Liao Q. et al.:

- "Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naive HIV-infected individuals from 40 United States cities", **HIV clinical trials**, Januar - Februar 2007, 8 (1), S. 1-8 und
- "Prevalence of Antiretroviral Drug Resistance and Resistance Mutations in Antiretroviral Therapy (ART) Naive HIV Infected Individuals from 44 US Cities During 2003", Abstract H-173, **44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, Washington DC 2004, <http://www.icaac.org/44th.asp>

Rubbert A., "Pathophysiologie der HIV-Infektion", HIV.net 2007, Abfrage am 23.06.2008, www.hiv.net

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Dezember 1977, 74 (12), S. 5463-5467

Saracino A., Monno L., Scudeller L. et al., "Impact of unreported HIV-1 RT mutations on phenotypic resistance", **Journal of Medical Virology**, Januar 2006, 78 (1), S. 9-17

Sato A. , Hammond J., Alexander T.N. et al., "In vitro selection of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that confer resistance to capravirine, a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor", **Antiviral Research**, Juni 2006, Vol. 70 (2), S. 66-74

Schmit J.C., Cogniaux J., Hermans P. et al., "Multiple drug resistance to nucleoside analogues and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in an efficiently replicating human immunodeficiency virus type 1 patient strain", **The Journal of Infectious Diseases**, November 1996, 174 (5), S. 962-968

Shafer R., Stanford University Drug Resistance Database:

- "Genotype-Phenotype Discordanzen", Abfrage am 12.11.2007,
<http://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/genoPheno.html>
- "**HIVseq Program: Mutation List Analysis**", Abfrage am 24.11.2007,
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivseq&action=showMutationForm
- "**Antiretroviral drug summary: Efavirenz (EFV; Sustiva)**", Abfrage am 25.11.2007, <http://hivdb.stanford.edu/pages/GRIP/EFV.html>
- "**Genotypic testing for HIV-1 Drug Resistance (2003)**", Abfrage am 11.08.2007, <http://hivdb.stanford.edu/modules/lookUpFiles/pdf/GenotypicResistance.pdf>
- "**Summary Statistics**", Stand: 02.03.2009, Abfrage am 29.03.2009,
<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/Summary.cgi>
- "**Genotypic testing for HIV-1 Drug Resistance (2003)**", Abfrage am 11.08.2007,
<http://hivdb.stanford.edu/modules/lookUpFiles/pdf/GenotypicResistance.pdf>
- "**HIVdb Program: Sequence Analysis**", Abfrage am 22.08.2007,
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showSequenceForm
- "**Antiretroviral drug summary: Tenofovir (TDF; Viread)**", Abfrage am 13.11.2007,
<http://hivdb.stanford.edu/pages/GRIP/TDF.html>
- "**Antiretroviral drug summary: Zidovudine (ZDV; Retrovir)**", Abfrage am 21.11.2007, <http://hivdb.stanford.edu/pages/GRIP/ZDV.html>
- "**NRTI Mutation Pattern & Susceptibility**", Abfrage am 25.11.2007, <http://hivdb.stanford.edu/pages/phenoSummary/Pheno.NRTI.Simple.html>
- "**NNRTI Mutation Pattern & Susceptibility**", Stanford University Drug Resistance Database, Abfrage am 21.12.2007, <http://hivdb.stanford.edu/pages/phenoSummary/Pheno.NNRTI.Simple.html>
- "**HIVseq Program: Sequence Analysis**", Abfrage am 23.01.2007, http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivseq&action=showSequenceForm
- "**HIVseq Program: Mutation List Analysis**", http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivseq&action=showMutationForm, Eingabe "T39K" oder "T39E" (Abfrage am 22.02.2007)

Shafer R.W., Eisen J.A. et al., "Sequence and drug susceptibility of subtype C reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in Zimbabwe", **Journal of Virology**, Juli 1997, 71 (7), S. 5441-5448

Shafer R.W., Kozal M.J., Winters M.A. et al., "Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations", **The Journal of Infectious Diseases**, April 1994, 169 (4), S. 722-729

Shirasaka T., Kavlick M.F., Ueno T. et al., "Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 14. März 1995, 92 (6), S. 2398-2402

Snoeck J., Kantor R., Shafer R.W. et al., "Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Februar 2006, 50 (2), S. 694-701

Stanfield-Oakley S. A., Jeffrey J. et al., "Determinants of susceptibility to enfuvirtide map to gp41 in enfuvirtide-naive HIV-1", **Antiviral Therapy**, 2003, 8, S25 (abstract no. 22), Abfrage am 09.03.2008,

<http://www.aegis.com/conferences/hivdrw/2003/22.pdf>

Stanford University HIV Drug Resistance Database, <http://hivdb.stanford.edu/index.html>:

- **Sequence Analysis Program**, Version 4.2.5, 2007-07-12, Abfrage am 20.08.2007,
http://hivdb.stanford.edu/pages/asi/releaseNotes/updates.html#Ver4.3.0_20070712
- **Programm "HIVseq: Sequence Analysis"**, Abfrage am 23.08.2007,
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivseq&action=showSequenceForm
- "**Resistance Notes**": "**NRTI Resistance Notes**" bzw. "**NNRTI Resistance Notes**" bzw. "**PI Resistance Notes**", Abfrage am 30.06.2005:
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/xmlTools/rules_scores_hivdb.cgi?class=NRTI bzw.
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/xmlTools/rules_comments_hivdb.cgi?class=NNRTI bzw.
http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/xmlTools/rules_comments_hivdb.cgi?class=PI
- "**Mutation Profile**": Abfrage am 25.09.2007,
<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/RTPosMutSummary.cgi> (für RT)
bzw. <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PRPosMutSummary.cgi> (für Protease)
- "**RT mutation profile**" bzw. "**Protease mutation profile**", Abfrage am 28.09.2007, <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/RTPosMutSummary.cgi> bzw.
<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PRPosMutSummary.cgi>
- **Sequenz-Referenz**, Abfrage am 23.06.2008,
<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/Reference.cgi?RefID=960&Gene=PR&Type=Clinical>

Steigbigel R., Kumar P. et al., "Results of BENCHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus", Abstract 105bLB, **14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Los Angeles 2007, Abfrage am 29.04.2007, <http://www.retroconference.org/2007/Abstracts/30688.htm>

Tanuri A., Vicente A.C., Otsuki K. et al., "Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Februar 1999, 43(2), S. 253-258; Patientenisolat am 08.11.2007 abgerufen unter <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/Reference.cgi?RefID=722&Gene=PR&Type=Clinical>

Taylor A.G., "SQL für Dummies", Verlag mitp, 2. Auflage, September 2001

Taylor B.S., Sobieszczyk M.E. et al., "The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity", **N Engl J Med**, 10. April 2008, 358 (15), S. 1590-1602

Thole G. H., "Therapieversagen unter Einsatz des ersten HIV-Fusionsinhibitors, T-20. Analyse von Resistenzmutationen", Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin, München, Ludwig-Maximilians-Universität, Medizinische Fakultät, 2008; abgerufen am 15.12.2008 unter <http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=989330753>

Truong H.M., Grant R.M., McFarland W. et al., "Routine surveillance for the detection of acute and recent HIV infections and transmission of antiretroviral resistance", **AIDS**, 14. November 2006, 20 (17), S. 2193-2197

Turner D., Brenner B., Wainberg M.A., "Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutations in the reverse transcriptase of HIV-1", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Januar 2004, 53 (1), S. 53-57

UNAIDS:

- "AIDS Epidemic Update December 2007", Abfrage am 26.06.2008, <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/default.asp>
- "Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008: executive summary", Abfrage am 04.02.2009, http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511_GR08_ExecutiveSummary_en.pdf

Van Laethem K., De Luca A., Antinori A. et al., "A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients", **Antiviral Therapy**, Juni 2002, 7(2), S. 123-129

Van Lunzen J., Schwew K., Kuhlmann B. et al., "High rate of virological failure during once daily therapy with tenofovir + didanosine 250mg + efavirenz in antiretroviral naive patients – Results of the 12 week interim analysis of the TEDDI trial" (Conference Abstract), **3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment**, 24.-27. Juli 2005, Rio de Janeiro, Abfrage am 13.11.2007, <http://www.ias-2005.org/abstract.aspx?elementId=2176698>

Vasudevachari M.B., Zhang Y.M., Imamichi H. et al., "Emergence of Protease Inhibitor Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients and Rapid Screening Procedure for Their Detection", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, November 1999, 40(11), S. 2535-2541

Vazquez de Parga E., Rakhmanova A., Pérez-Alvarez L. et al., "HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease resistance associated mutations and characteristic polymorphisms in different genetic forms from the Former Soviet Union", **International Conference on AIDS**, 11.-16. Juli 2004; Abstract Nr. B11208, abzufragen über <http://www.aegis.com/conferences/iac/2004/B11208.html>; veröffentlicht unter gleichem Titel im **Journal of Medical Virology**, November 2005, 77 (3), S. 337-344

Velazquez-Campoy A., Todd M.J. et al., "Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from African viral subtypes", **PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, 22. Mai 2001, 98 (9), S. 6062-6067

Vergne L., Peeters M., Mpoudi-Ngole E. et al., "Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients", **Journal of Clinical Microbiology**, November 2000, Vol. 38 (11), S. 3919-3925

Wainberg M.A., "HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance", **AIDS**, Juni 2004, 18, Anhang 3, S. S63 - S68

Wall L. et al., "Programmieren mit Perl", O'Reilly Verlag, 2. Auflage, korrigierter Nachdruck, Juli 2001

Weltgesundheitsorganisation (WHO), HIV Drug Resistance, Abfrage am 23.02.2009,
<http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/en/index.html>

Wensing A.M., van de Vijver D.A., Angarano G. et al., "Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management", **Journal of Infectious Diseases**, 15. September 2005, 192 (6), S. 958-966

Wikipedia Internet-Enzyklopädie:

- Stichwort "MySQL", Abfrage am 23.08.2007,
<http://de.wikipedia.org/wiki/MySQL>
- Stichwort "PHP", Abfrage am 23.08.2007, <http://de.wikipedia.org/wiki/Php>
- Stichwort "PhpMyAdmin", Abfrage am 23.08.2007, <http://de.wikipedia.org/wiki/PhpMyAdmin>
- Stichwort "Perl", Abfrage am 23.0.2007, <http://de.wikipedia.org/wiki/Perl>
- Stichwörter "Sequenzalignment", "Smith-Waterman-Algorithmus" bzw. "Needleman-Wunsch-Algorithmus", Abfrage am 24.08.2007, <http://de.wikipedia.org/wiki/Sequenzalignment> bzw. <http://de.wikipedia.org/wiki/Smith-Waterman-Algorithmus> bzw. <http://de.wikipedia.org/wiki/Needleman-Wunsch-Algorithmus>

Winters M.A., Coolley K.L., Girard Y.A. et al., "A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors", **Journal of Clinical Investigation**, 15. November 1998, 102 (10), S. 1769-1775

Witvrouw M., Pannecouque C., Van Laethem K. et al., "Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV", **AIDS**, 20. August 1999, 13 (12), S. 1477-1483

Wolf E., "Resistenzen", HIV.net 2008, Abfrage am 23.02.2009, <http://www.hiv.net/hivnet2008.pdf>

Wong J., Ignacio C.C., Torriani F. et al., "In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues", **Journal of Virology**, März 1997, 71 (3), S. 2059-2071

Wong R., Bodart V. et al., "Understanding the Interactions between CXCR4 and AMD11070, a First-in-class Small-molecule Antagonist of the HIV Coreceptor", Abstract 495, **14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Los Angeles 2007, Abfrage am 16.04.2008, <http://www.roetroconference.org/2007/Abstracts/29751.htm>

Yang K., Li J.Y., Bao Z.Y. et al., "Genotypic antiretroviral resistance testing and phylogenetic analysis of protease and reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve AIDS patients in Henan province", **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi** (Abstract auf Englisch unter [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?
db=PubMed&cmd=retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16053762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed&cmd=retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16053762) [Stand: 28.10.2007], Original-Artikel auf Chinesisch), Mai 2005, 26(5), S. 351-355

Yeni P.G., Hammer S.M., Carpenter C.C. et al., "Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel", **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, 10. Juli 2002, 288 (2), S. 222-235

Zaccarelli M., Perno C.F., Forbici F. et al., "Q151M-mediated multinucleoside resistance: prevalence, risk factors, and response to salvage therapy", **Clinical Infectious Diseases**, 1. Februar 2004, 38 (3), S. 433-437

Zhang Y.M. et al., "Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites", **Journal of Virology**, September 1997, 71 (9), S. 6662-6670

9. Verzeichnis der Bilder und Tabellen

A) Bilder:

1. HIV-Infizierte weltweit S. 7
Quelle: **UNAIDS**, "Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008: executive summary", Abfrage am 16.12.2008
2. HIV-Replikationszyklus S. 8
Quelle: **Weiss R.A.**, "Getting to know HIV", **Tropical Medicine and International Health**, Juli 2000, 5 (7), S. a10-a15
3. Struktur Reverse Transkriptase/Protease
 - a) Reverse Transkriptase S. 9
 - b) Protease S. 10

Quelle: **Clavel F. et al.**, "HIV Drug Resistance", **N Engl J Med**, 4. März 2004, 350 (10), S. 1023-1035
4. Printscreen mehrdeutiges Elektropherogramm S. 29
5. Verteilung Subtypen bei T39K S. 51/52
 - a) MvP: Alle Sequenzen
 - b) Stanford: Alle Sequenzen
 - c) Stanford: RTI-naiv
 - d) Stanford: NRTI
 - e) Stanford: NNRTI
6. Verteilung Subtypen bei T39E S. 53
 - a) MvP: Alle Sequenzen
 - b) Stanford: Alle Sequenzen
 - c) Stanford: RTI-naiv
 - d) Stanford: NRTI
 - e) Stanford: NNRTI

B) TABELLEN:

1. Prävalenz RT-assozierter Mutationen (Anhang)
 - a) NRTI-assoziierte Mutationen S. 85-88
 - b) NNRTI-assoziierte Mutationen S. 89-91
2. Prävalenz PI-assoziierte Mutationen (Anhang) S. 91-98
3. IUPAC-Code S. 23/24
Quelle: **International Union of pure and applied chemistry (IUPAC)**, "Recommendations on Organic & Biochemical Nomenclature, Symbols & Terminology etc.", <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>, **Abfrage am 02.04.2008**
4. Beispiele für degenerierte Basen S. 32

- | | | |
|----|---|-----------|
| 5. | <u>Sequentielles Auftreten von Mutationen unter Therapie</u> | S. 39 |
| | a) TDF und K65R
b) AZT und M41L
c) Atazanavir und I50L | |
| 6. | <u>Neu beschriebene Resistenzmutationen (Anhang)</u> | S. 99/100 |
| | a) NRTI-assoziierte Mutationen
b) NNRTI-assoziierte Mutationen | |
| 7. | <u>Klassischer Resistenzweg</u> | S. 45/46 |
| | a) Chronologische Reihenfolge der Ast-1- und Ast-2-Mutationen
b) Beispiele für Mutations-Ast 1
c) Beispiele für Mutations-Ast 2 | |
| 8. | <u>Kombinationen von Mutationen</u> | S. 47-49 |
| | a) RT: L100I + K103N
b) RT: E203K + D67N
c) RT: E203K + TAM
d) PR: R41K + H69K | |

10. Anhang

Tabelle 1 a) NRTI-assozierte Mutationen:

Teil 1 - In den Zeilen der Tabelle sind für jede untersuchte Mutations-relevante RT-Position verwertbare Sequenzen („Gesamtzahl Sequenzen“), Sequenzen mit Wildtyp (z.B. „M41“, „K65“ etc.), maximal („mögliche Mutationen“) und minimal („definitive Mutationen“) möglicher Anteil mutierter Sequenzen aufgeführt. Damit werden mehrdeutige Positionen, die sowohl die Aminosäure des Wildtypes als auch andere enthalten, berücksichtigt. In den Spalten sind absolute und relative Häufigkeit der entsprechenden Sequenzen aufgeteilt nach Jahr bzw. Gesamtzeitraum enthalten.

	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Anzahl Sequenzen	1249		424		251		268		201		104	
Position	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
M41												
mögliche Mutationen	396	33,03	154	39,69	78	32,37	87	32,95	57	28,36	20	19,23
definitive Mutationen	383	31,94	148	38,14	77	31,95	82	31,06	56	27,86	20	19,23
M41	803	66,97	234	60,31	163	67,63	177	67,05	144	71,64	84	80,77
Gesamtzahl Sequenzen	1199	100,00	388	100,00	241	100,00	264	100,00	201	100,00	104	100,00
E44												
mögliche Mutationen	135	11,26	53	13,66	26	10,79	33	12,50	18	8,96	5	4,81
definitive Mutationen	131	10,93	53	13,66	25	10,37	31	11,74	17	8,46	5	4,81
E44	1064	88,74	335	86,34	215	89,21	231	87,50	183	91,04	99	95,19
Gesamtzahl Sequenzen	1199	100,00	388	100,00	241	100,00	264	100,00	201	100,00	104	100,00
K65												
mögliche Mutationen	26	2,16	2	0,52	1	0,41	2	0,75	11	5,47	10	9,62
definitive Mutationen	25	2,08	2	0,52	0	0,00	2	0,75	11	5,47	10	9,62
K65	1176	97,84	386	99,48	240	99,59	265	99,25	190	94,53	94	90,38
Gesamtzahl Sequenzen	1202	100,00	388	100,00	241	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
D67												
mögliche Mutationen	381	31,78	120	31,09	93	38,59	79	29,70	63	31,34	26	25,00
definitive Mutationen	362	30,19	114	29,53	87	36,10	72	27,07	63	31,34	26	25,00
D67	818	68,22	266	68,91	148	61,41	187	70,30	138	68,66	78	75,00
Gesamtzahl Sequenzen	1199	100,00	386	100,00	241	100,00	266	100,00	201	100,00	104	100,00
T69												
mögliche Mutationen	143	11,90	44	11,34	22	9,13	34	12,73	29	14,43	14	13,46
definitive Mutationen	134	11,15	40	10,31	22	9,13	30	11,24	28	13,93	14	13,46
T69	1059	88,10	344	88,66	219	90,87	233	87,27	172	85,57	90	86,54
Gesamtzahl Sequenzen	1202	100,00	388	100,00	241	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
K70												
mögliche Mutationen	244	20,30	72	18,56	61	25,31	44	16,48	44	21,89	23	22,12
definitive Mutationen	228	18,97	68	17,53	59	24,48	34	12,73	44	21,89	23	22,12
K70	958	79,70	316	81,44	180	74,69	223	83,52	157	78,11	81	77,88
Gesamtzahl Sequenzen	1202	100,00	388	100,00	241	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
L74												
mögliche Mutationen	135	11,23	35	9,02	26	10,79	39	14,61	28	13,93	7	6,73
definitive Mutationen	122	10,15	31	7,99	25	10,37	31	11,61	28	13,93	7	6,73
L74	1067	88,77	353	90,98	215	89,21	228	85,39	173	86,07	97	93,27
Gesamtzahl Sequenzen	1202	100,00	388	100,00	241	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
V75												
mögliche Mutationen	78	6,49	22	5,67	18	7,47	16	5,99	13	6,47	9	8,65
definitive Mutationen	74	6,16	20	5,15	17	7,05	16	5,99	13	6,47	9	8,65
V75	1124	93,51	366	94,33	223	92,53	251	94,01	188	93,53	95	91,35
Gesamtzahl Sequenzen	1202	100,00	388	100,00	241	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
Y115												
mögliche Mutationen	10	0,80	0	0,00	3	1,20	0	0,00	4	1,99	3	2,88
definitive Mutationen	9	0,72	0	0,00	2	0,80	0	0,00	4	1,99	3	2,88
Y115	1236	99,20	421	100,00	248	98,80	268	100,00	197	98,01	101	97,12
Gesamtzahl Sequenzen	1246	100,00	421	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00
Q151												
mögliche Mutationen	22	1,76	8	1,89	3	1,20	3	1,12	4	1,99	4	3,85
definitive Mutationen	22	1,76	8	1,89	3	1,20	3	1,12	4	1,99	4	3,85
Q151	1227	98,24	416	98,11	248	98,80	265	98,88	197	98,01	100	96,15
Gesamtzahl Sequenzen	1249	100,00	424	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00

Tabelle 1 a) NRTI-assozierte Mutationen (Teil 1)

M184														
mögliche Mutationen	530	42,43	177	41,75	109	43,43	108	40,30	90	44,78	46	44,23		
definitive Mutationen	518	41,47	170	40,09	108	43,03	104	38,81	90	44,78	46	44,23		
M184	719	57,57	247	58,25	142	56,57	160	59,70	111	55,22	58	55,77		
Gesamtzahl Sequenzen	1249	100,00	424	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00		
L210														
mögliche Mutationen	282	22,65	117	27,79	57	22,71	60	22,39	35	17,41	13	12,62		
definitive Mutationen	276	22,17	117	27,79	55	21,91	56	20,90	35	17,41	13	12,62		
L210	963	77,35	304	72,21	194	77,29	208	77,61	166	82,59	90	87,38		
Gesamtzahl Sequenzen	1245	100,00	421	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	103	100,00		
T215														
mögliche Mutationen	538	43,28	197	46,90	123	49,00	112	41,79	74	37,00	32	31,07		
definitive Mutationen	530	42,64	196	46,67	122	48,61	106	39,55	74	37,00	32	31,07		
T215	705	56,72	223	53,10	128	51,00	156	58,21	126	63,00	71	68,93		
Gesamtzahl Sequenzen	1243	100,00	420	100,00	251	100,00	268	100,00	200	100,00	103	100,00		
K219														
mögliche Mutationen	339	27,34	102	24,40	81	32,40	75	27,99	55	27,50	26	25,24		
definitive Mutationen	327	26,37	97	23,21	79	31,60	70	26,12	55	27,50	26	25,24		
K219	901	72,66	316	75,60	169	67,60	193	72,01	145	72,50	77	74,76		
Gesamtzahl Sequenzen	1240	100,00	418	100,00	250	100,00	268	100,00	200	100,00	103	100,00		
F227														
mögliche Mutationen	16	1,30	4	0,97	5	2,01	4	1,49	1	0,50	2	1,94		
definitive Mutationen	14	1,14	4	0,97	5	2,01	2	0,75	1	0,50	2	1,94		
F227	1216	98,70	408	99,03	244	97,99	264	98,51	198	99,50	101	98,06		
Gesamtzahl Sequenzen	1232	100,00	412	100,00	249	100,00	268	100,00	199	100,00	103	100,00		

Tabelle 1a) NRTI-assozierte Mutationen (Teil 1, Fortsetzung)

Teil 2 – Für jedes untersuchte Codon sind vorkommende Mutationen und Permutationen mehrdeutiger Positionen aufgelistet, jeweils mit absoluter und relativer Häufigkeit pro Jahr bzw. Gesamtzeitraum.

Codon mit Wildtyp	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen (Gesamt)		1249		424		251		268		201		104	
M41													
Sequenzen an Pos. 41		1199		389		241		264		201		104	
M41L	381	30,50		148	34,91	75	29,88	82	30,60	56	27,86	20	19,23
ML	11	0,88		4	0,94	1	0,40	5	1,87	1	0,50	0	0,00
IM	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
!L	1	0,08		0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KTRM	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
ISWL	1	0,08		0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	50	4,00		35	8,25	10	3,98	4	1,49	0	0,00	0	0,00
E44	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 44		1199		388		241		264		201		104	
E44D	88	7,05		39	9,2	13	5,18	21	7,84	10	4,98	5	4,81
A	42	3,36		13	3,07	12	4,78	10	3,73	7	3,48	0	0,00
ED	2	0,16		0	0	0	0,00	1	0,37	1	0,50	0	0,00
EA	1	0,08		0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KE	1	0,08		0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
DAGV	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	50	4,00		36	8,49	10	3,98	4	1,49	0	0,00	0	0,00
K65	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 65		1202		388		241		267		201		104	
K65R	25	2,00		2	0,47	0	0,00	2	0,75	11	5,47	10	9,62
KN	1	0,08		0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	47	3,76		36	8,49	10	3,98	1	0,37	0	0,00	0	0,00
D67	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 67		1199		386		241		266		201		104	
D67N	318	25,46		104	24,53	78	31,08	62	23,13	53	26,37	21	20,19
D67G	30	2,40		7	1,65	7	2,79	7	2,61	6	2,99	3	2,88
ND	17	1,36		5	1,18	5	1,99	7	2,61	0	0,00	0	0,00
S	5	0,40		0	0	1	0,40	0	0,00	3	1,49	1	0,96
E	4	0,32		3	0,71	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
H	4	0,32		0	0	0	0,00	2	0,75	1	0,50	1	0,96
DG	2	0,16		1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
SG	1	0,08		0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
-	50	4,00		38	8,96	10	3,98	2	0,75	0	0,00	0	0,00

Tabelle 1 a) NRTI-assozierte Mutationen (Teil 2)

T69	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 69		1202		388		241		267		201		104	
Insertion Codon 69													
	Insert. 69.01	8	0,64	1	0,24	1	0,40	1	0,37	5	2,49	0	0,00
	Insertion C	6	0,48	1	0,24	1	0,40	1	0,37	3	1,49	0	0,00
	Insertion S	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	Insertion A	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	Insert. 69.02	8	0,64	1	0,24	1	0,40	1	0,37	5	2,49	0	0,00
	Insertion G	6	0,48	1	0,24	1	0,40	1	0,37	3	1,49	0	0,00
	Insertion A	2	0,16	0	0	0	0,00	0	0,00	2	1,00	0	0,00
T69	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 69		1202		388		241		267		201		104	
	T69 D	57	4,56	25	5,9	7	2,79	9	3,36	11	5,47	5	4,81
	T69 N	47	3,76	7	1,65	11	4,38	14	5,22	9	4,48	6	5,77
	T69 S	16	1,28	2	0,47	2	0,80	3	1,12	7	3,48	2	1,92
	ND	5	0,40	1	0,24	1	0,40	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	TA	4	0,32	3	0,71	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	A	3	0,24	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	G	3	0,24	2	0,47	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	NT	3	0,24	1	0,24	0	0,00	2	0,75	0	0,00	0	0,00
	I	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	M	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	DA	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	TI	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	TS	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	-	47	3,76	36	8,49	10	3,98	1	0,37	0	0,00	0	0,00
K70	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 70		1202		388		241		267		201		104	
	K70R	215	17,21	66	15,57	56	22,31	32	11,94	41	20,40	20	19,23
	KR	12	0,96	3	0,71	1	0,40	8	2,99	0	0,00	0	0,00
	E	4	0,32	0	0	0	0,00	0	0,00	2	1,00	2	1,92
	S	4	0,32	1	0,24	2	0,80	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	G	2	0,16	0	0	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	T	2	0,16	1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	KE	2	0,16	0	0	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	N	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	KREG	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	KTRI	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	47	3,76	36	8,49	10	3,98	1	0,37	0	0,00	0	0,00
L74	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 74		1202		388		241		267		201		104	
	L74V	92	7,37	20	4,72	21	8,37	22	8,21	24	11,94	5	4,81
	I	29	2,32	10	2,36	4	1,59	9	3,36	4	1,99	2	1,92
	IL	5	0,40	2	0,47	1	0,40	2	0,75	0	0,00	0	0,00
	VL	5	0,40	2	0,47	0	0,00	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	IVL	3	0,24	0	0	0	0,00	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	IV	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	47	3,76	36	8,49	10	3,98	1	0,37	0	0,00	0	0,00
V75	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 75		1202		388		241		267		201		104	
	V75M	33	2,64	9	2,12	9	3,59	8	2,99	6	2,99	1	0,96
	I	25	2,00	7	1,65	3	1,20	4	1,49	6	2,99	5	4,81
	T	9	0,72	3	0,71	3	1,20	2	0,75	0	0,00	1	0,96
	A	2	0,16	0	0	2	0,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	L	2	0,16	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,92
	S	2	0,16	1	0,24	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	IV	2	0,16	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	TA	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	IMV	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	EAGV	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	-	47	3,76	36	8,49	10	3,98	1	0,37	0	0,00	0	0,00
Y115	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 115		1246		421		251		268		201		104	
	Y115F	9	0,72	0	0	2	0,80	0	0,00	4	1,99	3	2,88
	YF	1	0,08	0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	3	0,24	3	0,71	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabelle 1 a) NRTI-assoziierte Mutationen (Teil 2 - Fortsetzung)

Q151	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 151		1249		424		251		268		201		104	
	Q151M	22	1,76	8	1,89	3	1,20	3	1,12	4	1,99	4	3,85
M184	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 184		1249		424		251		268		201		104	
	M184V	491	39,31	162	38,21	102	40,64	98	36,57	83	41,29	46	44,23
	I	27	2,16	8	1,89	6	2,39	6	2,24	7	3,48	0	0,00
	MV	10	0,80	6	1,42	1	0,40	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	IM	2	0,16	1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	-	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
L210	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 210		1245		421		251		268		201		104	
	L210W	251	20,10	106	25	49	19,52	50	18,66	33	16,42	13	12,50
	F	13	1,04	5	1,18	3	1,20	5	1,87	0	0,00	0	0,00
	WL	5	0,40	0	0	1	0,40	4	1,49	0	0,00	0	0,00
	Y	4	0,32	2	0,47	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	M	2	0,16	2	0,47	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	S	2	0,16	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	V	2	0,16	1	0,24	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	E	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	G	1	0,08	0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	IL	1	0,08	0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	4	0,32	3	0,71	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
T215	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 215		1243		420		251		268		200		103	
	T215Y	383	30,66	158	37,26	80	31,87	77	28,73	52	25,87	16	15,38
	F	96	7,69	27	6,37	28	11,16	18	6,72	16	7,96	7	6,73
	S	11	0,88	3	0,71	2	0,80	2	0,75	2	1,00	2	1,92
	E	10	0,80	2	0,47	6	2,39	1	0,37	1	0,50	0	0,00
	I	9	0,72	0	0	2	0,80	2	0,75	0	0,00	5	4,81
	C	7	0,56	3	0,71	2	0,80	0	0,00	1	0,50	1	0,96
	D	3	0,24	1	0,24	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	NTYS	3	0,24	0	0	0	0,00	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	H	2	0,16	0	0	0	0,00	0	0,00	2	1,00	0	0,00
	L	2	0,16	1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	TA	2	0,16	1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	TI	2	0,16	0	0	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	YC	2	0,16	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	V	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	IF	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	IV	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	LF	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	TS	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	YF	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	A	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	G	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	N	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	6	0,48	4	0,94	0	0,00	0	0,00	1	0,50	1	0,96
K219	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 219		1240		418		250		268		200		103	
	K219Q	150	12,01	45	10,61	36	14,34	29	10,82	27	13,43	13	12,50
	E	65	5,20	18	4,25	13	5,18	15	5,60	14	6,97	5	4,81
	N	61	4,88	20	4,72	15	5,98	13	4,85	11	5,47	2	1,92
	R	36	2,88	11	2,59	10	3,98	9	3,36	3	1,49	3	2,88
	KE	5	0,40	3	0,71	1	0,40	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	H	4	0,32	2	0,47	2	0,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	KQ	4	0,32	1	0,24	0	0,00	3	1,12	0	0,00	0	0,00
	G	3	0,24	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	W	3	0,24	0	0	1	0,40	2	0,75	0	0,00	0	0,00
	D	2	0,16	0	0	1	0,40	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	KR	2	0,16	1	0,24	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	T	1	0,08	0	0	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
	ED	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	KN	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	NS	1	0,08	0	0	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	-	9	0,72	6	1,42	1	0,40	0	0,00	1	0,50	1	0,96
F227	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 227		1232		412		249		268		199		103	
	L	14	1,14	4	0,97	5	2,01	2	0,75	1	0,50	2	1,94
	LF	2	0,16	0	0	0	0,00	2	0,75	0	0,00	0	0,00
	-	17	1,38	12	2,91	2	0,80	0	0,00	2	1,01	1	0,97

Tabelle 1 a) NRTI-assoziierte Mutationen (Teil 2 - Fortsetzung)

Tabelle 1 b) NNRTI-assozierte Mutationen:

Teil 1 - Verwertbare Sequenzen („Gesamtzahl Sequenzen“), Sequenzen mit Wildtyp (z.B. „M41“, „K65“ etc.), maximal („mögliche Mutationen“) und minimal („definitive Mutationen“) möglicher Anteil mutierter Sequenzen, geordnet nach Jahren.

	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Anzahl Sequenzen	1249		424		251		268		201		104	
Position	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
L100												
Mögliche Mutationen	44	3,59	12	2,93	6	2,46	11	4,12	8	3,98	7	6,73
Definitive Mutationen	40	3,26	8	1,96	6	2,46	11	4,12	8	3,98	7	6,73
L100	1182	96,41	397	97,07	238	97,54	256	95,88	193	96,02	97	93,27
Gesamtzahl Sequenzen	1226	100,00	409	100,00	244	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
K101												
Mögliche Mutationen	127	10,35	37	9,05	27	11,02	27	10,11	27	13,43	9	8,65
Definitive Mutationen	118	9,62	35	8,56	27	11,02	21	7,87	26	12,94	9	8,65
K101	1100	89,65	372	90,95	218	88,98	240	89,89	174	86,57	95	91,35
Gesamtzahl Sequenzen	1227	100,00	409	100,00	245	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
K103												
Mögliche Mutationen	318	25,87	118	28,78	58	23,58	66	24,72	48	23,88	28	26,92
Definitive Mutationen	306	24,90	113	27,56	57	23,17	60	22,47	48	23,88	28	26,92
K103	911	74,13	292	71,22	188	76,42	201	75,28	153	76,12	76	73,08
Gesamtzahl Sequenzen	1229	100,00	410	100,00	246	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00
V106												
Mögliche Mutationen	46	3,72	15	3,61	10	4,03	15	5,60	4	1,99	2	1,92
Definitive Mutationen	40	3,23	13	3,13	9	3,63	12	4,48	4	1,99	2	1,92
V106	1191	96,28	400	96,39	238	95,97	253	94,40	197	98,01	102	98,08
Gesamtzahl Sequenzen	1237	100,00	415	100,00	248	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00
Y181												
Mögliche Mutationen	181	14,49	55	12,97	41	16,33	40	14,93	32	15,92	13	12,50
Definitive Mutationen	170	13,61	49	11,56	38	15,14	38	14,18	32	15,92	13	12,50
Y181	1068	85,51	369	87,03	210	83,67	228	85,07	169	84,08	91	87,50
Gesamtzahl Sequenzen	1249	100,00	424	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00
Y188												
Mögliche Mutationen	45	3,60	6	1,42	6	2,39	19	7,09	9	4,48	5	4,81
Definitive Mutationen	43	3,44	6	1,42	5	1,99	18	6,72	9	4,48	5	4,81
Y188	1204	96,40	418	98,58	245	97,61	249	92,91	192	95,52	99	95,19
Gesamtzahl Sequenzen	1249	100,00	424	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00
G190												
Mögliche Mutationen	144	11,53	55	12,97	27	10,76	29	10,82	23	11,44	10	9,62
Definitive Mutationen	136	10,89	51	12,03	27	10,76	25	9,33	23	11,44	10	9,62
G190	1105	88,47	369	87,03	224	89,24	239	89,18	178	88,56	94	90,38
Gesamtzahl Sequenzen	1249	100,00	424	100,00	251	100,00	268	100,00	201	100,00	104	100,00
P225												
Mögliche Mutationen	17	1,38	7	1,69	2	0,80	6	2,24	1	0,50	1	0,97
Definitive Mutationen	16	1,29	6	1,45	2	0,80	6	2,24	1	0,50	1	0,97
P225	1219	98,62	407	98,31	248	99,20	262	97,76	200	99,50	102	99,03
Gesamtzahl Sequenzen	1236	100,00	414	100,00	250	100,00	268	100,00	201	100,00	103	100,00
M230												
Mögliche Mutationen	6	0,49	2	0,49	3	1,20	1	0,37	0	0,00	0	0,00
Definitive Mutationen	4	0,33	1	0,25	2	0,80	1	0,37	0	0,00	0	0,00
M230	1221	99,51	406	99,51	246	98,80	267	99,63	201	100,00	101	100,00
Gesamtzahl Sequenzen	1227	100,00	408	100,00	249	100,00	268	100,00	201	100,00	101	100,00

Tabelle 1 b) NNRTI-assozierte Mutationen (Teil 1)

Teil 2 – Häufigkeit der vorkommende Mutationen und Permutationen

Position (Wildtyp)	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen (Gesamt)		1249		424		251		268		201		104	
L100													
Sequenzen an Pos. 100		1226		409		244		267		201		104	
L100I	39	3,18		7	1,71	6	2,46	11	4,12	8	3,98	7	6,73
IL	3	0,24		3	0,73	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
V	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
X (alle Aminosäuren)	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	23	1,88		15	3,67	7	2,87	1	0,37	0	0,00	0	0,00
K101	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 101		1227		409		245		267		201		104	
K101E	56	4,56		20	4,89	10	4,08	10	3,75	11	5,47	5	4,81
Q	35	2,85		13	3,18	9	3,67	4	1,50	6	2,99	3	2,88
H	9	0,73		0	0,00	3	1,22	2	0,75	4	1,99	0	0,00
R	8	0,65		1	0,24	2	0,82	2	0,75	2	1,00	1	0,96
KE	6	0,49		2	0,49	0	0,00	4	1,50	0	0,00	0	0,00
A	3	0,24		0	0,00	0	0,00	2	0,75	1	0,50	0	0,00
P	3	0,24		1	0,24	1	0,41	0	0,00	1	0,50	0	0,00
KQ	2	0,16		0	0,00	0	0,00	1	0,37	1	0,50	0	0,00
V	1	0,08		0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
EA	1	0,08		0	0,00	1	0,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00
ED	1	0,08		0	0,00	1	0,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KN	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
QP	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
-	22	1,79		15	3,67	6	2,45	1	0,37	0	0,00	0	0,00
K103	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 103		1229		410		246		267		201		104	
K103N	280	22,78		105	25,61	51	20,73	56	20,97	43	21,39	25	24,04
R	15	1,22		4	0,98	5	2,03	2	0,75	2	1,00	2	1,92
KN	9	0,73		4	0,98	1	0,41	4	1,50	0	0,00	0	0,00
NS	3	0,24		1	0,24	1	0,41	0	0,00	1	0,50	0	0,00
H	2	0,16		0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,00	0	0,00
KNRS	2	0,16		1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
D	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
I	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Q	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
S	1	0,08		0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,96
KR	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
RS	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
NTSI	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
T	0	0,00		0	0,00								
-	20	1,63		14	3,41	5	2,03	1	0,37	0	0,00	0	0,00
V106	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 106		1237		415		248		268		201		104	
V106I	24	1,94		9	2,17	4	1,61	9	3,36	2	1,00	0	0,00
A	10	0,81		4	0,96	4	1,61	1	0,37	0	0,00	1	0,96
M	5	0,40		0	0,00	1	0,40	1	0,37	2	1,00	1	0,96
AV	2	0,16		1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
IV	2	0,16		0	0,00	0	0,00	2	0,75	0	0,00	0	0,00
G	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
MV	1	0,08		0	0,00	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
IVL	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	12	0,97		9	2,17	3	1,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Y181	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 181		1249		424		251		268		201		104	
Y181C	166	13,29		48	11,32	38	15,14	36	13,43	31	15,42	13	12,50
YC	10	0,80		5	1,18	3	1,20	2	0,75	0	0,00	0	0,00
I	3	0,24		1	0,24	0	0,00	1	0,37	1	0,50	0	0,00
IF	1	0,08		0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
NY	1	0,08		1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
-	0	0,00		0	0,00								

Tabelle 1 b) NNRTI-assozierte Mutationen (Teil 2)

Y188	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 188		1249		424		251		268		201		104	
	Y188L	34	2,72	5	1,18	5	1,99	14	5,22	6	2,99	4	3,85
	H	4	0,32	1	0,24	0	0,00	1	0,37	1	0,50	1	0,96
	C	2	0,16	0	0,00	0	0,00	2	0,75	0	0,00	0	0,00
	D	1	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	F	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	HL	1	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,50	0	0,00
	!Y	1	0,08	0	0,00	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	HLYF	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	-	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
G190	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 190		1249		424		251		268		201		104	
	G190A	119	9,53	44	10,38	24	9,56	18	6,72	23	11,44	10	9,62
	S	12	0,96	5	1,18	2	0,80	5	1,87	0	0,00	0	0,00
	GA	7	0,56	3	0,71	0	0,00	4	1,49	0	0,00	0	0,00
	RS	2	0,16	1	0,24	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	E	1	0,08	0	0,00	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	R	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	AS	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	RG	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	C	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Q	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	T	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	V	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
P225	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 225		1236		414		250		268		201		103	
	P225H	16	1,29	6	1,45	2	0,80	6	2,24	1	0,50	1	0,97
	HP	1	0,08	1	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	13	1,05	10	2,42	1	0,40	0	0,00	1	0,50	1	0,97
M230	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 225		1227		408		249		268		201		101	
	M230L	4	0,33	1	0,25	2	0,80	1	0,37	0	0,00	0	0,00
	IM	2	0,16	1	0,25	1	0,40	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	-	22	1,79	16	3,92	2	0,80	0	0,00	3	1,49	1	0,99

Tabelle 1 b) NNRTI-assozierte Mutationen (Teil 2 - Fortsetzung)

Tabelle 2) PI-assozierte Mutationen:

Teil 1 - Verwertbare Sequenzen („Gesamtzahl Sequenzen“), Sequenzen mit Wildtyp (z.B. „M41“, „K65“ etc.), maximal („mögliche Mutationen“) und minimal („definitive Mutationen“) möglicher Anteil mutierter Sequenzen, geordnet nach Jahren.

	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Anzahl Sequenzen	1239		416		251		255		214		103	
Position	Gesamtzeitraum	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
L10												
Sequenzen an Pos. 10	1239		416		251		255		214		103	
mögliche Mutationen	439	35,43	155	37,26	77	30,68	99	38,82	68	31,78	40	38,83
definitive Mutationen	429	34,62	148	35,58	76	30,28	97	38,04	68	31,78	40	38,83
L10	800	64,57	261	62,74	174	69,32	156	61,18	146	68,22	63	61,17
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103	100
I13												
Sequenzen an Pos. 13	1239		416		251		255		214		103	
mögliche Mutationen	366	29,54	96	23,08	73	29,08	81	31,76	77	35,98	39	37,86
definitive Mutationen	357	28,81	94	22,6	70	27,89	77	30,2	77	35,98	39	37,86
I13	873	70,46	320	76,92	178	70,92	174	68,24	137	64,02	64	62,14
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103	100
G16												
Sequenzen an Pos. 16	1239		416		251		255		214		103	
mögliche Mutationen	73	5,89	21	5,05	8	3,19	21	8,24	18	8,41	5	4,85
definitive Mutationen	66	5,33	20	4,81	8	3,19	17	6,67	16	7,48	5	4,85
G16	1166	94,11	395	94,95	243	96,81	234	91,76	196	91,59	98	95,15
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103	100

Tabelle 2) PI-assozierte Mutationen (Teil 1)

Tabelle 2) PI-assozierte Mutationen (Teil 1 - Fortsetzung)

I50											
Sequenzen an Pos. 50	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	18	1,45	1	0,24	3	1,2	10	3,92	3	1,4	1
definitive Mutationen	15	1,21	1	0,24	3	1,2	7	2,75	3	1,4	1
I50	1221	98,55	415	99,76	248	98,8	245	96,08	211	98,6	102
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
F53											
Sequenzen an Pos. 53	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	44	3,55	18	4,33	3	1,2	10	3,92	9	4,21	4
definitive Mutationen	41	3,31	17	4,09	3	1,2	8	3,14	9	4,21	4
F53	1195	96,45	398	95,67	248	98,8	245	96,08	205	95,79	99
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
I54											
Sequenzen an Pos. 54	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	186	15,01	51	12,26	34	13,55	47	18,43	39	18,22	15
definitive Mutationen	181	14,61	50	12,02	34	13,55	43	16,86	39	18,22	15
I54	1053	84,99	365	87,74	217	86,45	208	81,57	175	81,78	88
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
Q58											
Sequenzen an Pos. 58	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	60	4,84	16	3,85	9	3,59	14	5,49	14	6,54	7
definitive Mutationen	56	4,52	14	3,37	9	3,59	12	4,71	14	6,54	7
Q58	1179	95,16	400	96,15	242	96,41	241	94,51	200	93,46	96
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
D60											
Sequenzen an Pos. 60	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	115	9,28	31	7,45	23	9,16	26	10,2	21	9,81	14
definitive Mutationen	109	8,8	30	7,21	23	9,16	22	8,63	20	9,35	14
D60	1124	90,72	385	92,55	228	90,84	229	89,8	193	90,19	89
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
I62											
Sequenzen an Pos. 62	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	369	29,78	127	30,53	58	23,11	92	36,08	55	25,7	37
definitive Mutationen	354	28,57	126	30,29	55	21,91	82	32,16	54	25,23	37
I62	870	70,22	289	69,47	193	76,89	163	63,92	159	74,3	66
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
L63											
Sequenzen an Pos. 63	1239		416		251		255		214		103
mögliche Mutationen	934	75,38	315	75,72	187	74,5	202	79,22	156	72,9	74
definitive Mutationen	928	74,9	315	75,72	186	74,1	198	77,65	155	72,43	74
L63	305	24,62	101	24,28	64	25,5	53	20,78	58	27,1	29
Gesamtzahl Sequenzen	1239	100	416	100	251	100	255	100	214	100	103
H69											
Sequenzen an Pos. 69	1238		415		251		255		214		103
mögliche Mutationen	294	23,75	78	18,8	64	25,5	58	22,75	57	26,64	37
definitive Mutationen	294	23,75	78	18,8	64	25,5	58	22,75	57	26,64	37
H69	944	76,25	337	81,2	187	74,5	197	77,25	157	73,36	66
Gesamtzahl Sequenzen	1238	100	415	100	251	100	255	100	214	100	103
A71											
Sequenzen an Pos. 71	1238		415		251		255		214		103
mögliche Mutationen	282	22,78	98	23,61	50	19,92	63	24,71	52	24,3	19
definitive Mutationen	271	21,89	93	22,41	48	19,12	59	23,14	52	24,3	19
A71	956	77,22	317	76,39	201	80,08	192	75,29	162	75,7	84
Gesamtzahl Sequenzen	1238	100	415	100	251	100	255	100	214	100	103
G73											
Sequenzen an Pos. 73	1238		415		251		255		214		103
mögliche Mutationen	113	9,13	44	10,6	20	7,97	23	9,02	21	9,81	5
definitive Mutationen	112	9,05	44	10,6	19	7,57	23	9,02	21	9,81	5
G73	1125	90,87	371	89,4	231	92,03	232	90,98	193	90,19	98
Gesamtzahl Sequenzen	1238	100	415	100	251	100	255	100	214	100	103
T74											
Sequenzen an Pos. 74	1238		415		251		255		214		103
mögliche Mutationen	142	11,47	55	13,25	25	9,96	29	11,37	24	11,21	9
definitive Mutationen	140	11,31	53	12,77	25	9,96	29	11,37	24	11,21	9
T74	1096	88,53	360	86,75	226	90,04	226	88,63	190	88,79	94
Gesamtzahl Sequenzen	1238	100	415	100	251	100	255	100	214	100	103
V77											
Sequenzen an Pos. 77	1237		415		251		255		214		102
mögliche Mutationen	295	23,85	106	25,54	56	22,31	59	23,14	53	24,77	21
definitive Mutationen	283	22,88	104	25,06	55	21,91	51	20	52	24,3	21
V77	942	76,15	309	74,46	195	77,69	196	76,86	161	75,23	81
Gesamtzahl Sequenzen	1237	100	415	100	251	100	255	100	214	100	102

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 1 – Fortsetzung)

V82											
Sequenzen an Pos. 82	1236		414		251		255		214		102
mögliche Mutationen	177	14,32	65	15,7	29	11,55	39	15,29	31	14,49	13
definitive Mutationen	167	13,51	59	14,25	28	11,16	37	14,51	30	14,02	13
V82	1059	85,68	349	84,3	222	88,45	216	84,71	183	85,51	89
Gesamtzahl Sequenzen	1236	100	414	100	251	100	255	100	214	100	102
N83											
Sequenzen an Pos. 83	1235		414		251		254		214		102
mögliche Mutationen	12	0,97	6	1,45	1	0,4	4	1,57	1	0,47	0
definitive Mutationen	9	0,73	4	0,97	1	0,4	3	1,18	1	0,47	0
N83	1223	99,03	408	98,55	250	99,6	250	98,43	213	99,53	102
Gesamtzahl Sequenzen	1235	100	414	100	251	100	254	100	214	100	102
I84											
Sequenzen an Pos. 84	1235		414		251		254		214		102
mögliche Mutationen	104	8,42	35	8,45	17	6,77	23	9,06	22	10,28	7
definitive Mutationen	100	8,1	34	8,21	17	6,77	21	8,27	21	9,81	7
I84	1131	91,58	379	91,55	234	93,23	231	90,94	192	89,72	95
Gesamtzahl Sequenzen	1235	100	414	100	251	100	254	100	214	100	102
I85											
Sequenzen an Pos. 85	1234		414		250		254		214		102
mögliche Mutationen	36	2,92	11	2,66	8	3,2	7	2,76	6	2,8	4
definitive Mutationen	32	2,59	8	1,93	8	3,2	6	2,36	6	2,8	4
I85	1198	97,08	403	97,34	242	96,8	247	97,24	208	97,2	98
Gesamtzahl Sequenzen	1234	100	414	100	250	100	254	100	214	100	102
N88											
Sequenzen an Pos. 88	1233		413		250		254		214		102
mögliche Mutationen	44	3,57	11	2,66	12	4,8	10	3,94	7	3,27	4
definitive Mutationen	43	3,49	10	2,42	12	4,8	10	3,94	7	3,27	4
N88	1189	96,43	402	97,34	238	95,2	244	96,06	207	96,73	98
Gesamtzahl Sequenzen	1233	100	413	100	250	100	254	100	214	100	102
L90											
Sequenzen an Pos. 90	1231		412		249		254		214		103
mögliche Mutationen	318	25,83	122	29,61	64	25,7	59	23,23	53	24,77	21
definitive Mutationen	311	25,26	120	29,13	61	24,5	57	22,44	53	24,77	21
L90	913	74,17	290	70,39	185	74,3	195	76,77	161	75,23	82
Gesamtzahl Sequenzen	1231	100	412	100	249	100	254	100	214	100	103

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 1 – Fortsetzung)

Teil 2 – Häufigkeit der vorkommende Mutationen und Permutationen

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 2)

K20	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 20		1239		416		251		255		214		103	
	K20I	102	8,23	29	6,97	23	9,16	17	6,67	23	10,75	10	9,71
	R	89	7,18	21	5,05	16	6,37	23	9,02	20	9,35	9	8,74
	M	34	2,74	15	3,61	4	1,59	8	3,14	6	2,8	1	0,97
	T	33	2,66	14	3,37	6	2,39	5	1,96	6	2,8	2	1,94
	V	25	2,02	5	1,2	5	1,99	7	2,75	4	1,87	4	3,88
	KR	6	0,48	2	0,48	0	0	4	1,57	0	0	0	0
	L	4	0,32	1	0,24	2	0,8	0	0	1	0,47	0	0
	E	2	0,16	1	0,24	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	KM	2	0,16	0	0	1	0,4	1	0,39	0	0	0	0
	KT	2	0,16	0	0	0	0	2	0,78	0	0	0	0
	KTR	2	0,16	0	0	0	0	2	0,78	0	0	0	0
	IV	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	ML	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	NK	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	RM	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	TI	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L24	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 24		1239		416		251		255		214		103	
	L24I	8	0,65	1	0,24	3	1,2	2	0,78	2	0,93	0	0
	F	3	0,24	2	0,48	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	IL	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	IVL	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,97
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D30	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 30		1239		416		251		255		214		103	
	D30N	35	2,82	9	2,16	8	3,19	9	3,53	6	2,8	3	2,91
	Y	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	ND	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V32	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 32		1239		416		251		255		214		103	
	V32I	27	2,18	4	0,96	6	2,39	8	3,14	7	3,27	2	1,94
	GV	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	A	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	E	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	G	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	EAG	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L33	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 33		1239		416		251		255		214		103	
	L33F	59	4,76	4	0,96	9	3,59	19	7,45	23	10,75	4	3,88
	I	18	1,45	5	1,2	2	0,8	5	1,96	5	2,34	1	0,97
	V	15	1,21	6	1,44	0	0	4	1,57	3	1,4	2	1,94
	IV	3	0,24	1	0,24	0	0	2	0,78	0	0	0	0
	LF	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	M	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	IL	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E35	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 35		1239		416		251		255		214		103	
	E35D	408	32,93	128	30,77	87	34,66	88	34,51	70	32,71	35	33,98
	N	14	1,13	1	0,24	4	1,59	4	1,57	3	1,4	2	1,94
	G	3	0,24	0	0	2	0,8	0	0	1	0,47	0	0
	E!	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0
	ED	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0
	A	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	Q	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	V	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	EAG	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M36	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 36		1239		416		251		255		214		103	
	M36I	476	38,42	136	32,69	101	40,24	91	35,69	100	46,73	48	46,6
	L	15	1,21	2	0,48	2	0,8	3	1,18	8	3,74	0	0
	IM	14	1,13	1	0,24	1	0,4	12	4,71	0	0	0	0
	V	9	0,73	4	0,96	2	0,8	2	0,78	1	0,47	0	0
	IV	3	0,24	0	0	1	0,4	1	0,39	1	0,47	0	0
	T	2	0,16	0	0	0	0	1	0,39	0	0	1	0,97
	IML	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	M	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	ML	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	MV	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	RM	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 2 - Fortsetzung)

R41	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 41		1239		416		251		255		214		103	
	R41K	435	35,11	126	30,29	93	37,05	79	30,98	85	39,72	52	50,49
	KR	9	0,73	3	0,72	0	0	6	2,35	0	0	0	0
	N	7	0,56	2	0,48	0	0	1	0,39	2	0,93	2	1,94
	RI	7	0,56	7	1,68	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	4	0,32	4	0,96	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K43	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 43		1239		416		251		255		214		103	
	K43R	38	3,07	16	3,85	11	4,38	2	0,78	6	2,8	3	2,91
	T	24	1,94	6	1,44	3	1,2	9	3,53	5	2,34	1	0,97
	E	2	0,16	1	0,24	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	N	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0
	KN	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	I	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	Q	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	KR	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	KT	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	KNE	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M46	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 46		1239		416		251		255		214		103	
	M46I	113	9,12	41	9,86	22	8,76	21	8,24	18	8,41	11	10,68
	L	70	5,65	24	5,77	10	3,98	17	6,67	15	7,01	4	3,88
	IM	4	0,32	3	0,72	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	V	3	0,24	0	0	0	0	3	1,18	0	0	0	0
	ML	3	0,24	1	0,24	1	0,4	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I47	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 47		1239		416		251		255		214		103	
	I47V	29	2,34	3	0,72	6	2,39	9	3,53	7	3,27	4	3,88
	MI	2	0,16	0	0	0	0	2	0,78	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G48	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 48		1239		416		251		255		214		103	
	G48V	40	3,23	25	6,01	7	2,79	4	1,57	2	0,93	2	1,94
	M	4	0,32	0	0	1	0,4	3	1,18	0	0	0	0
	R	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	2	0,16	0	0	0	0	1	0,39	0	0	1	0,97
	GV	2	0,16	1	0,24	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	E	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	RG	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	GAV	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I50	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 50		1239		416		251		255		214		103	
	I50V	14	1,13	1	0,24	3	1,2	7	2,75	3	1,4	0	0
	L	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,97
	IV	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	MI	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	MIV	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F53	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 53		1239		416		251		255		214		103	
	F53L	35	2,82	15	3,61	3	1,2	5	1,96	9	4,21	3	2,91
	Y	3	0,24	2	0,48	0	0	0	0	0	0	1	0,97
	YSC	3	0,24	0	0	0	0	3	1,18	0	0	0	0
	CF	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	LF	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	SF	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I54	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 54		1239		416		251		255		214		103	
	I54V	109	8,8	35	8,41	19	7,57	26	10,2	21	9,81	8	7,77
	L	31	2,5	6	1,44	3	1,2	8	3,14	10	4,67	4	3,88
	M	24	1,94	3	0,72	8	3,19	7	2,75	5	2,34	1	0,97
	T	9	0,73	5	1,2	2	0,8	0	0	1	0,47	1	0,97
	S	5	0,4	0	0	2	0,8	2	0,78	1	0,47	0	0
	IV	3	0,24	0	0	0	0	3	1,18	0	0	0	0
	A	2	0,16	1	0,24	0	0	0	0	0	0	1	0,97
	MI	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	TI	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	VL	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q58	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 58		1239		416		251		255		214		103	
	Q58E	55	4,44	13	3,13	9	3,59	12	4,71	14	6,54	7	6,8
	EQ	3	0,24	2	0,48	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	K	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	QH	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 2 - Fortsetzung)

D60	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 60		1239		416		251		255		214		103	
	D60E	106	8,56	29	6,97	22	8,76	22	8,63	19	8,88	14	13,59
	ED	5	0,4	1	0,24	0	0	3	1,18	1	0,47	0	0
	N	2	0,16	1	0,24	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	G	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	NHD	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I62	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 62		1239		416		251		255		214		103	
	I62V	348	28,09	125	30,05	55	21,91	79	30,98	52	24,3	37	35,92
	IV	14	1,13	1	0,24	3	1,2	9	3,53	1	0,47	0	0
	M	3	0,24	0	0	0	0	2	0,78	1	0,47	0	0
	T	2	0,16	0	0	0	0	1	0,39	1	0,47	0	0
	L	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	MI	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L63	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 63		1239		416		251		255		214		103	
	L63P	668	53,91	230	55,29	146	58,17	129	50,59	115	53,74	48	46,6
	T	74	5,97	15	3,61	15	5,98	23	9,02	12	5,61	9	8,74
	S	52	4,2	24	5,77	5	1,99	12	4,71	7	3,27	4	3,88
	A	44	3,55	14	3,37	8	3,19	15	5,88	6	2,8	1	0,97
	Q	33	2,66	11	2,64	2	0,8	7	2,75	7	3,27	6	5,83
	V	11	0,89	3	0,72	0	0	4	1,57	2	0,93	2	1,94
	H	9	0,73	5	1,2	1	0,4	0	0	2	0,93	1	0,97
	CF	8	0,65	4	0,96	0	0	2	0,78	1	0,47	1	0,97
	M	5	0,4	0	0	4	1,59	0	0	0	0	1	0,97
	PL	5	0,4	0	0	0	0	4	1,57	1	0,47	0	0
	E	3	0,24	1	0,24	1	0,4	0	0	0	0	1	0,97
	I	3	0,24	1	0,24	1	0,4	0	0	1	0,47	0	0
	AP	3	0,24	1	0,24	0	0	2	0,78	0	0	0	0
	R	2	0,16	0	0	1	0,4	0	0	1	0,47	0	0
	DVH	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	N	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	EQ	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	HY	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	IV	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	PS	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	TP	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	TS	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	EAQ	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	QHL	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	TIA	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	TPA	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H69	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 69		1238		415		251		255		214		103	
	H69K	228	18,42	52	12,53	52	20,72	44	17,25	51	23,83	29	28,16
	N	31	2,5	14	3,37	5	1,99	7	2,75	2	0,93	3	2,91
	Q	12	0,97	2	0,48	3	1,2	3	1,18	1	0,47	3	2,91
	R	10	0,81	4	0,96	1	0,4	1	0,39	2	0,93	2	1,94
	Y	10	0,81	5	1,2	3	1,2	2	0,78	0	0	0	0
	L	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	S	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	KR	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
	-	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
A71	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 71		1238		415		251		255		214		103	
	A71V	187	15,11	69	16,63	31	12,35	41	16,08	36	16,82	10	9,71
	T	72	5,82	22	5,3	16	6,37	17	6,67	11	5,14	6	5,83
	I	11	0,89	2	0,48	1	0,4	1	0,39	4	1,87	3	2,91
	AV	5	0,4	2	0,48	1	0,4	2	0,78	0	0	0	0
	TA	4	0,32	3	0,72	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	L	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	AP	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	TIA	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	-	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0
G73	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 73		1238		415		251		255		214		103	
	G73S	70	5,65	30	7,23	10	3,98	14	5,49	13	6,07	3	2,91
	T	31	2,5	9	2,17	7	2,79	7	2,75	6	2,8	2	1,94
	A	7	0,57	4	0,96	1	0,4	1	0,39	1	0,47	0	0
	C	2	0,16	1	0,24	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	ST	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0
	KNT	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0
	STG	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0
	-	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 2 – Fortsetzung)

T74	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 74		1238		415		251		255		214		103	
S	92	7,43	36	8,67	16	6,37	16	6,27	18	8,41	6	5,83	
A	24	1,94	10	2,41	5	1,99	3	1,18	3	1,4	3	2,91	
T74P	18	1,45	6	1,45	3	1,2	6	2,35	3	1,4	0	0	
E	3	0,24	0	0	0	0	3	1,18	0	0	0	0	
TS	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	
K	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0	
IS	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
AS	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
-	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
V77	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 77		1237		415		251		255		214		102	
V77I	278	22,47	104	25,06	54	21,51	50	19,61	49	22,9	21	20,59	
IV	10	0,81	2	0,48	1	0,4	6	2,35	1	0,47	0	0	
L	4	0,32	0	0	0	0	1	0,39	3	1,4	0	0	
ILV	2	0,16	0	0	0	0	2	0,78	0	0	0	0	
-	2	0,16	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0,98	
T	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0	
V82	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 82		1236		414		251		255		214		102	
V82A	99	8,01	37	8,94	17	6,77	22	8,63	17	7,94	6	5,88	
I	29	2,35	8	1,93	6	2,39	5	1,96	7	3,27	3	2,94	
F	15	1,21	4	0,97	2	0,8	3	1,18	2	0,93	4	3,92	
T	10	0,81	6	1,45	1	0,4	2	0,78	1	0,47	0	0	
C	7	0,57	2	0,48	3	1,2	2	0,78	0	0	0	0	
IV	6	0,49	3	0,72	2	0,8	1	0,39	0	0	0	0	
-	3	0,24	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0,98	
GA	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	
GV	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	
G	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
L	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0	
M	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
S	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
AS	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
AV	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
GAV	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0	
N83	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 83		1235		414		251		254		214		102	
-	4	0,32	2	0,48	0	0	1	0,39	0	0	1	0,98	
N83H	2	0,16	0	0	1	0,4	1	0,39	0	0	0	0	
I	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
Y	2	0,16	1	0,24	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
D	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	
S	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
NI	2	0,16	2	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	
NSI	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
I84	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 84		1235		414		251		254		214		102	
I84V	97	7,85	31	7,49	17	6,77	21	8,27	21	9,81	7	6,86	
IV	4	0,32	1	0,24	0	0	2	0,79	1	0,47	0	0	
-	4	0,32	2	0,48	0	0	1	0,39	0	0	1	0,98	
C	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
L	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
M	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I85	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 85		1234		414		250		254		214		102	
I85V	31	2,51	8	1,93	8	3,2	6	2,36	5	2,34	4	3,92	
-	5	0,41	2	0,48	1	0,4	1	0,39	0	0	1	0,98	
IV	3	0,24	3	0,72	0	0	0	0	0	0	0	0	
N	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0	
NI	1	0,08	0	0	0	0	1	0,39	0	0	0	0	
N88	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 88		1233		413		250		254		214		102	
N88D	34	2,76	8	1,94	8	3,2	9	3,54	5	2,34	4	3,92	
S	7	0,57	1	0,24	4	1,6	1	0,39	1	0,47	0	0	
-	6	0,49	3	0,73	1	0,4	1	0,39	0	0	1	0,98	
H	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
Y	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0	
ND	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
L90	Mutationen	Gesamt	Gesamt (%)	2000	2000 (%)	2001	2001 (%)	2002	2002 (%)	2003	2003 (%)	2004	2004 (%)
Sequenzen an Pos. 90		1231		412		249		254		214		102	
L90M	305	24,78	118	28,64	59	23,69	56	22,05	52	24,3	20	19,61	
-	8	0,65	4	0,97	2	0,8	1	0,39	0	0	1	0,97	
ML	6	0,49	1	0,24	3	1,2	2	0,79	0	0	0	0	
V	3	0,24	1	0,24	1	0,4	1	0,39	0	0	0	0	
I	1	0,08	0	0	1	0,4	0	0	0	0	0	0	
S	1	0,08	0	0	0	0	0	0	1	0,47	0	0	
W	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	
WL	1	0,08	1	0,24	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle 2) PI-assoziierte Mutationen (Teil 2 – Fortsetzung)

Tabelle 6 – Prävalenz neu beschriebener Resistenz-relevanter Mutationen nach Saracino:

Für die entsprechende RT-Positionen sind jeweils die Häufigkeit des Wildtyps, der neu beschriebenen Resistenz-Mutation, aller Mutationen und aller verwertbarer Sequenzen („Sequenzen gesamt“) angegeben. „Mischformen“ berücksichtigen Sequenzen, die durch degenerierte Basen nicht eindeutig definiert sind und sowohl dem Wildtyp als auch einer Mutation entsprechen könnte.

Teil 1 – Prävalenz NRTI-assoziierter Mutationen in der MvP-Datenbank

Position 20	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	944	83,47	301	85,03	190	81,55	206	83,40	166	85,13	80	79,21
K20R	179	15,83	51	14,41	39	16,74	39	15,79	29	14,87	21	20,79
Alle Mutationen	180	15,92	51	14,41	40	17,17	39	15,79	29	14,87	21	20,79
„Mischformen“	7	0,62	2	0,56	3	1,29	2	0,81	0	0,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1131	100,00	354	100	233	100,00	247	100,00	195	100,00	101	100,00

Position 39	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	934	77,96	325	83,76	184	76,35	200	75,76	145	72,14	79	75,96
T39A	126	10,52	31	7,99	27	11,20	27	10,23	30	14,93	11	10,58
Alle Mutationen	252	21,04	59	15,21	56	23,24	57	21,59	55	27,36	25	24,04
„Mischformen“	12	1,00	4	1,03	1	0,41	7	2,65	1	0,50	0	0,00
Sequenzen gesamt	1198	100,00	388	100	241	100,00	264	100,00	201	100,00	104	100,00

Position 43	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1024	85,40	327	84,28	205	85,06	220	83,33	177	88,06	94	90,38
K43E	89	7,42	27	6,96	23	9,54	23	8,71	13	6,47	3	2,88
K43Q	46	3,84	17	4,38	7	2,90	11	4,17	7	3,48	4	3,85
K43N	20	1,67	10	2,58	2	0,83	4	1,52	1	0,50	3	2,88
K43E/Q/N	155	12,93	54	13,92	32	13,28	38	14,39	21	10,45	10	9,62
Alle Mutationen	163	13,59	56	14,43	35	14,52	40	15,15	22	10,95	10	9,62
„Mischformen“	12	1,00	5	1,29	1	0,41	4	1,52	2	1,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1199	100,00	388	100	241	100,00	264	100,00	201	100,00	104	100,00

Position 203	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1097	87,97	372	87,94	221	88,05	232	86,57	178	88,56	93	90,29
E203K	79	6,34	30	7,09	21	8,37	17	6,34	12	5,97	6	5,83
E203D	41	3,29	17	4,02	5	1,99	11	4,10	6	2,99	2	1,94
E203K/D	120	9,62	40	9,46	26	10,36	28	10,45	18	8,96	8	7,77
Alle Mutationen	140	11,23	47	11,11	29	11,55	31	11,57	23	11,44	10	9,71
„Mischformen“	10	0,80	4	0,95	1	0,40	5	1,87	0	0,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1247	100,00	423	100	251	100,00	268	100,00	201	100,00	103	100,00

Position 208	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1147	92,05	393	93,13	230	91,63	244	91,04	183	91,04	96	93,20
H208Y	87	6,98	24	5,69	20	7,97	20	7,46	16	7,96	7	6,80
Alle Mutationen	92	7,38	26	6,16	21	8,37	22	8,21	16	7,96	7	6,80
„Mischformen“	7	0,56	3	0,71	0	0,00	2	0,75	2	1,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1246	100,00	422	100	251	100,00	268	100,00	201	100,00	103	100,00

Position 218	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1170	94,13	401	95,48	233	92,83	254	94,78	187	93,50	94	91,26
D218E	70	5,63	18	4,29	17	6,77	14	5,22	12	6,00	9	8,74
Alle Mutationen	70	5,63	18	4,29	17	6,77	14	5,22	12	6,00	9	8,74
„Mischformen“	3	0,24	1	0,24	1	0,40	0	0,00	1	0,50	0	0,00
Sequenzen gesamt	1243	100,00	420	100	251	100,00	268	100,00	200	100,00	103	100,00

Tabelle 6) Neu beschriebene Resistenz-relevante Mutationen (Teil 1 – NRTI-assozierte Mutationen)

Teil 2 – Prävalenz NNRTI-assozierter Mutationen in der MvP-Datenbank

Position 101	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1099	89,64	372	90,95	218	88,98	240	89,89	174	86,57	95	91,35
K101E	56	4,57	20	4,89	10	4,08	10	3,75	11	5,47	5	4,81
K101Q	35	2,85	13	3,18	9	3,67	4	1,50	6	2,99	3	2,88
K101P	3	0,24	1	0,24	1	0,41	0	0,00	1	0,50	0	0,00
K101EQP	94	7,67	34	8,31	20	8,16	14	5,24	18	8,96	8	7,69
Alle Mutationen	118	9,62	35	8,56	27	11,02	21	7,87	26	12,94	9	8,65
„Mischformen“	9	0,73	2	0,49	0	0,00	6	2,25	1	0,50	0	0,00
Sequenzen gesamt	1226	100,00	409	100,00	245	100,00	267	100,00	201	100,00	104	100,00

Position 221	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1182	95,40	401	95,93	239	95,60	251	93,66	191	95,50	100	97,09
H221Y	50	4,04	14	3,35	10	4,00	14	5,22	9	4,50	3	2,91
Alle Mutationen	51	4,12	14	3,35	11	4,40	14	5,22	9	4,50	3	2,91
„Mischformen“	6	0,48	3	0,72	0	0,00	3	1,12	0	0,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1239	100,00	418	100,00	250	100,00	268	100,00	200	100,00	103	100,00

Position 223	Gesamt	[%]	2000	[%]	2001	[%]	2002	[%]	2003	[%]	2004	[%]
Wildtyp	1186	95,80	401	96,16	237	94,80	255	95,15	194	97,00	99	96,12
K223E	18	1,45	5	1,20	6	2,40	3	1,12	2	1,00	2	1,94
K223Q	21	1,70	8	1,92	4	1,60	6	2,24	3	1,50	0	0,00
K223EQ	39	3,15	13	3,12	10	4,00	9	3,36	5	2,50	2	1,94
Alle Mutationen	49	3,96	14	3,36	13	5,20	12	4,48	6	3,00	4	3,88
„Mischformen“	3	0,24	2	0,48	0	0,00	1	0,37	0	0,00	0	0,00
Sequenzen gesamt	1238	100,00	417	100,00	250	100,00	268	100,00	200	100,00	103	100,00

Tabelle 6) Neu beschriebene Resistenz-relevante Mutationen (Teil 2 – NNRTI-assoziierte Mutationen)

11. Danksagung

Viele Menschen haben direkt oder indirekt zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen. Ihnen allen gilt mein Dank.

Bedanken möchte ich mich im Speziellen bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Josef Eberle, der mich mit seiner freundlichen und interessierten Art stets für die Hintergründe der HIV-Infektion zu begeistern wusste, sich während der Entstehung der Arbeit immer wieder geduldig Zeit für mich nahm und mich insgesamt selbständig arbeiten ließ.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Obermeier bedanken, ohne dessen bioinformatisches und medizinisches Wissen diese Arbeit und die zu Grunde liegende Datenbank niemals entstanden wäre. Er erklärte mir seine Vorstellungen stets geduldig und opferte für die Betreuung viel Zeit.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Großmutter möchte ich für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung danken. Ebenso gilt mein Dank der Familie meiner Frau, von der ich von Beginn an freundlich aufgenommen wurde und auf deren Hilfsbereitschaft ich stets zählen konnte.

Ganz besonders möchte ich meiner Ehefrau, Julia Braun, danken, die immer für mich da ist, mich liebevoll in allen Belangen unterstützt und an Ihrer Lebensfreude teilhaben lässt.

12. Lebenslauf

Sebastian Ulrich Braun

Geburtstag/-ort:	26. März 1980, Würzburg
Familienstand:	Verheiratet
Eltern:	Dr. Wolfgang und Magdalena Braun
Geschwister:	Anna Barbara Braun
1986 - 1990:	Grundschulen „St. Ägidius“ und „Am Eichenwald“, Neusäß
1990 - 1999:	Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg; Allgemeine Hochschulreife
1999 - 2000:	Zivildienst, Krankenpflegedienst, Psychiatrie, Bezirkskrankenhaus Augsburg
10/2000:	Beginn des Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
09/2002:	Ärztliche Vorprüfung
09/2003:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004:	Beginn der Dissertation „Etablierung einer HIV-Sequenzdatenbank am Max von Pettenkofer-Institut“ bei Prof. Dr. Josef Eberle, MvP, LMU München
09/2005:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005 - 09/2006:	<i>Praktisches Jahr</i>
10/2005- 01/2006:	<i>Innere Medizin, Universitätsklinikum Großhadern, München: Medizinische Klinik I und II (Kardiologie, Gastroenterologie)</i>
02 - 05/2006:	<i>Chirurgie, Universitätsspital Zürich: Neurochirurgische Klinik, Kliniken für Unfallchirurgie und für Viszeralchirurgie und Transplantationsmedizin</i>
06 - 09/2006:	<i>Kinderheilkunde, Kreisklinikum Starnberg, Kinderklinik</i>
09/2006:	Hospitanz: Praktikum in der Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum der Universität Tokyo, Japan
12/2006:	Abschluss des Studiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Approbation als Arzt
03/2007 – 03/2009:	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Luzerner Kantonsspital Wolhusen, Schweiz
Seit 05/2009:	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Stadtspital Waid, Zürich, Schweiz