

Aus dem Max-von-Pettenkofer Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Lehrstuhl Virologie

Vorstand: Prof. Dr. U. Koszinowski

**Phänotypische Resistenzbestimmung gegenüber
HIV-1-Proteaseinhibitoren
Vergleich von DNA vs. RNA als Patientenmaterial**

Dissertation

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

vorgelegt von

Ulrike Heid
geb. Strommer
aus Schongau

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. von der Helm

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Rosenecker

Prof. Dr. Chr. P. Sommerhoff

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Nitschko

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Virus und Epidemiologie.....	8
1.2. Pathogenese	8
1.2.1. Übertragungswege und zelluläre Infektion.....	8
1.2.2. Krankheitsverlauf	10
1.3. Antiretrovirale Therapie (ART).....	13
1.3.1. Rolle der HIV-kodierten Enzyme Reverse Transkriptase und Protease..	13
1.3.1.1. Hemmer der Reversen Transkriptase (RT).....	13
1.3.1.2. Hemmer der Protease (PR)	15
1.3.1.2.1. Eigenschaften und Rolle der Protease im Lebenszyklus des Virus	16
1.3.2. Therapiestandard.....	18
1.3.2.1. Nebenwirkungsprofil der Proteaseinhibitoren	20
1.3.2.2. Resistenzentwicklung	21
1.3.2.2.1. Äußere, pharmakologische Faktoren.....	21
1.3.2.2.2. Virologische Ursachen.....	22
1.4. Verfahren zur Resistenztestung	23
1.4.1. Genotypische Testverfahren	24
1.4.2. Phänotypische Testverfahren	25
1.4.3. Beschreibung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Methode.....	26
1.5. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	27
2. Material und Methoden.....	30
2.1. Material und Bezugsquellen	30
2.1.1. HIV-Isolate	30
2.1.2. E. coli	30
2.1.3. Medien	30
2.1.3.1. Für die Anzucht von E.coli	30
2.1.3.2. Für die Anzucht elektrokompenter Zellen	30
2.1.4. Lösungen und Puffer.....	31
2.1.5. Chemikalien	33
2.1.6. Besondere Chemikalien	34
2.1.7. Enzyme.....	35

2.1.8. Besondere Materialien und Testkits	35
2.1.9. Geräte	36
2.1.10. Software zur Auswertung der enzymkinetischen Messungen	37
2.1.11. Substrate der HIV-1 Protease	37
2.1.12. Inhibitoren der HIV-Protease.....	37
2.1.13. Plasmide	37
2.1.14. Größenstandards DNA / Proteingel	38
2.1.15. Oligonukleotide	38
2.1.16. Untersuchungsmaterial	38
2.2. Methoden	39
2.2.1. Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden.....	39
2.2.2. E. coli – Kultur	39
2.2.3. Glycerinkultur	39
2.2.4. Isolierung von Nukleinsäuren.....	39
2.2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus PBMCs von Patienten.....	39
2.2.4.2. Isolierung von viraler RNA aus Patientenplasma.....	40
2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	40
2.2.4.3.1. Minipräparation.....	40
2.2.4.3.2. Midipräparation.....	41
2.2.5. Molekulargenetische Ansätze	41
2.2.5.1. Reverse Transkription.....	41
2.2.5.2. Nested Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.5.3. Ausschluss der Kontamination von DNA in der RNA-Extraktion.....	44
2.2.5.4. PCR mit Plasmid als Matrize für Sequenzierung	45
2.2.5.5. Sequenzierung der amplifizierten HIV-1-Protease-Fragmente	45
2.2.5.5.1. Sequenzierungsreaktion	46
2.2.5.5.2. Aufreinigung des Sequenzansatzes	46
2.2.5.5.3. Sequenzanalyse	47
2.2.6. Agarosegel-Elektrophorese.....	47
2.2.7. Analyse des PCR-Produktes aus DNA / cDNA.....	48
2.2.8. Präparatives Gel und Elution des Proteasefragmentes aus dem Agarosegel.....	48
2.2.9. Restriktion	48
2.2.10. Aufreinigung des Restriktionsansatzes	49

2.2.11. Bestimmung der Konzentration des geschnittenen Proteasefragmentes	49
2.2.12. Vektorherstellung	49
2.2.12.1. Allgemeines	49
2.2.12.2. Midipräparation des Plasmids pBD2	50
2.2.12.3. Konzentrationsbestimmung des Plasmids	50
2.2.12.4. Restriktion und Aufreinigung des Plasmids	51
2.2.13. Ligation	51
2.2.14. Elektrotransformation	52
2.2.14.1. Vorbereitung des Ligationsansatzes für die Elektroporation	52
2.2.14.2. Herstellung elektrokompenter Zellen	52
2.2.14.3. Elektroporation	53
2.2.15. Kultur der transformierten Zellen	54
2.3. Proteinchemische Methoden	55
2.3.1. Gewinnung der Protease aus Bakterienzellen	55
2.3.2. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Protease (PR)-Lösung	56
2.3.3. SDS-PAGE mit Tricingel	57
2.3.4. Silberfärbung des SDS-Proteingehaltes	58
2.4. Phänotypische Resistenzbestimmung der HIV-Protease	58
2.4.1. Ermittlung der phänotypischen Resistenz über Reversed Phase Chromatographie (RFC) mit Hilfe einer Endpunktbestimmung	58
2.4.1.1. Spaltungsansatz und Inhibitionsreaktion	58
2.4.1.2. RPC-Analyse	59
2.4.2. Ermittlung der phänotypischen Resistenz mit Hilfe einer kontinuierlichen, enzymkinetischen Messung unter Verwendung eines Fluoreszenzsubstrates	60
2.4.2.1. Testprinzip	60
2.4.2.2. Handhabung und Lagerung der verwendeten Reagenzien	61
2.4.2.3. Aktivitätsmessung der Protease im Küvettenformat	62
2.4.2.3.1. Allgemeines	62
2.4.2.3.2. Versuchsansatz	62
2.4.2.3.3. Auswertung der enzymkinetischen Daten aus Flukol4 mit Flukin49	63
2.4.3. Aktivitätsmessung der Protease im Mikrotiterplattenformat	63

2.4.3.1. Allgemeines	63
2.4.3.2. Versuchsdurchführung.....	64
2.4.3.3. Erstellung einer EDANS-Eichgerade	64
2.4.3.4. Theoretische Grundlagen der Enzyminhibition	65
2.4.3.5. Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i) des Enzym-Inhibitor- Komplexes mit Hilfe des Kurvenanpassungsprogrammes Figure P	66
2.4.4. Berechnung der Resistenzfaktoren.....	67
2.4.5. Vergleich mit genotypischen Resistenzergebnissen	67
3. Ergebnisse	69
3.1. Allgemeines.....	69
3.2. Verbesserung der Amplifikationseffizienz durch die Einführung neuer Primer in die 2. PCR.....	69
3.3. Vergleichende Messungen: RPC-Analyse und Fluoreszenztestung	70
3.4. Ermittlung der DNA-Kontamination in RNA-Extraktionen.....	72
3.5. Technische Variationsbreite bei der Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_i	73
3.5.1. Testdurchführung im Küvettenformat.....	73
3.5.1.1. Schwankungsfaktoren ab RNA-Extraktion.....	73
3.5.1.2. Faktor der Schwankungsbreite ab 2. PCR.....	74
3.5.1.3. Schwankungsfaktor ab Fluoreszenzmessung.....	74
3.5.2. Testdurchführung im Mikrotiterplattenformat: Schwankungsfaktoren ab Fluoreszenzmessung.....	74
3.5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	75
3.6. Bestimmung der „Inhibitionskonstanten“ (K_i) der Wildtyp-Protease.....	76
3.7. Enzymkinetische Auswertung des Inhibitionsverhalten von Lopinavir.....	77
3.8. Phänotypische Resistenzanalyse von HIV-1 Patientenproteasen	78
3.8.1. Vergleich von DNA versus RNA als Ausgangsmaterial zur rekombinanten Herstellung der HIV Protease in Zusammenschau mit virologischen und pharmakologischen Daten	78
3.8.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	84
3.9. Vergleich der phänotypischen Resistenzergebnisse aus HIV-RNA mit den genotypischen Daten	85
4. Diskussion.....	92

4.1. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	92
4.2. Stand der Forschung.....	92
4.2.1. DNA vs. RNA-Vergleiche	92
4.2.2. Korrelation eigener Ergebnisse mit Literaturdaten	94
4.3. Ursprung der HIV-RNA im Patienten-Plasma und Beitrag zellulärer und anderer anatomischer Reservoirs zur Plasmavirämie	95
4.4. Ursprung der HIV-DNA.....	97
4.4.1. Aktivierte, produktiv-infizierte, CD4 positive T-Lymphozyten	97
4.4.2. Ruhende und aktivierte CD4 positive T-Lymphozyten mit nicht-integrierter HIV-DNA.....	97
4.4.3. Ruhende CD4 positive Gedächtniszellen mit integrierter DNA/latent- infizierte Zellen.....	98
4.4.4. Naive CD4 positive T-Lymphozyten mit integrierter DNA.....	101
4.4.5. Monozyten	102
4.5. Interpretation der erhaltenen Daten in Bezug auf die patientenspezifischen Laborparameter Viruslast und CD4-Zellzahl.....	102
4.6. Interpretation der Daten in Hinblick auf die virale Dynamik	104
4.6.1. Interpretation der Resistenz-Unterschiede bei 3 Patienten	104
4.6.2. Interpretation beim Vorliegen übereinstimmender Resistenzmuster in DNA und RNA.....	105
4.7. Konsequenzen aus den vorgelegten Ergebnissen für eine phänotypische Resistenztestung	106
4.8. Zusammenfassung.....	107
5. Literaturverzeichnis.....	109
5.1. Publikationen.....	109
5.2. Webseiten	126
Anhang	127
Abkürzungsverzeichnis.....	129
Danksagung.....	131
Lebenslauf	133
Publikationen	135

1. Einleitung

1.1. Virus und Epidemiologie

1981 wurde in New York und Los Angeles erstmals die Beobachtung gemacht, dass zunächst gesunde homosexuelle Männer an einer Immundefizienz litten, die mit ernsthaften opportunistischen Infektionen und seltenen malignen Erkrankungen, wie dem Kaposisarkom, einherging. 1983 / 1984 wurde schließlich ein neues Retrovirus aus T-Zellen betroffener Patienten isoliert (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984) und für das „acquired immune deficiency syndrome“ (AIDS) verantwortlich gemacht.

Retroviren besitzen eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), welche die Viren befähigt, die eigenen genomischen RNA-Kopien in DNA „rückwärts“ umzuschreiben. Diese doppelsträngige cDNA wird in das Genom der infizierten Wirtszelle genetisch stabil integriert, sodass alle lebensfähigen Tochterzellen dieses sog. „Provirus“ enthalten. Das Virus gehört zur Gattung der Lentiviren.

1986 gab man dem Virus die heute international gebräuchliche Bezeichnung HIV (Human Immunodeficiency Virus). Nachdem 1986 ein antigen-differentierender Stamm in Westafrika entdeckt wurde, bezeichnete man diesen als HIV-2, den ursprünglichen und weitaus häufigeren als HIV-1. HIV-1 wird mittlerweile in mindestens 9 Subtypen unterteilt, diese unterscheiden sich in bestimmten Sequenzbereichen. Da HIV-2 eine sehr untergeordnete Rolle spielt, wird im Folgenden nur von HIV als HIV-1 berichtet.

Ende 2005 waren weltweit 40,3 Millionen Menschen mit HIV infiziert, der Grossteil der Betroffenen lebt in Afrika. Allein 2005 starben 3,1 Millionen Menschen an den Folgen dieser Infektionskrankheit, während sich weitere 4,9 Millionen neu infizierten (Epidemiologische Daten UNAIDS, siehe Webseite 1). In Deutschland lebten Ende 2005 49.000 HIV-Infizierte. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Zahl der HIV-Neuinfektionen im Vergleich zum Vorjahreszeitraum um 20 % angestiegen ist (Epidemiologische Daten des RKI, siehe Webseite 2).

1.2. Pathogenese

1.2.1. Übertragungswege und zelluläre Infektion

HIV wird durch Geschlechtsverkehr, Blut oder Blutprodukte, intrauterin, perinatal oder durch Muttermilch übertragen. Das Virus bindet über das virus-kodierte env Gly-

koprotein (gp120) an den CD4-Rezeptor und den Chemokin-Corezeptor CCR5 oder CXCR4 an die Oberfläche der Zielzelle. Die Mehrzahl der CD4-positiven Zellen sind T-Helferzellen, daneben besitzen aber auch deren Vorläuferstufen im Knochenmark und Thymus sowie Monozyten / Makrophagen und dendritische Zellen (Langerhanszellen der Haut, Astrozyten, Mikroglia) diesen Rezeptor. Seltener können auch noch andere humane Zellen infiziert werden (siehe Anhang 1). Diskutiert wird in diesen Fällen die Bindung des Virions über weitere Rezeptoren wie dem Glykolipid Galaktosylceramid (galC), den Komplement-Rezeptor und den Fc-Rezeptor. Für die Pathogenese von HIV sind allerdings vorwiegend die CD4-positiven Helferzellen von Bedeutung, die zusammen mit den Monozyten / Makrophagen die Hauptzielzellen darstellen.

Wie oben erwähnt, muss HIV neben der Bindung an den CD4-Rezeptor zusätzlich mit bestimmten Co-Rezeptoren wie CCR5, CXCR4 interagieren, wobei der Chemokinrezeptor CCR5 vor allem auf Makrophagen, dendritischen Zellen und CD4 positiven T-Zellen und der Chemokinrezeptor CXCR4 überwiegend auf aktivierten T-Zellen zu finden ist (Janeway, 2002). CCR5 kann auch von der Ursprungszelle abgelöst und auf CCR5-negative Zellen übertragen werden, die dann infiziert werden können (Mack et al., 2000). Die Bindung an Rezeptor und Corezeptor führt zu einer Konformationsänderung im env-Protein gp 120 und im transmembranären Hüllprotein gp 41, die die Fusion zwischen Virus- und Zellmembran einleitet und so dem Virion den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Nach der Entfernung der Hülle erreicht die genomische HIV RNA in Form eines Nukleoproteinkomplexes das Zytoplasma. Diese RNA wird dort mit Hilfe der Reversen Transkriptase in eine doppelsträngige, sogenannte cDNA umgeschrieben, in einen Präintegrationskomplex eingeschleust und gelangt so in den Kern der Wirtszelle. An beiden Enden der DNA befinden sich identische Bereiche, die als Long Terminal Repeats (LTRs) bezeichnet werden. Das viruskodierte Enzym Integrase bewirkt den Einbau der linearen cDNA über diese LTRs in das Genom der Zelle. Als Nebenprodukte des Integrationsprozesses können im Zellkern auch zirkuläre Formen der viralen DNA auftreten (Furtado et al., 1999). Der Integrationsprozess findet nur bei Aktivierung von T-Helferzellen statt, z.B. durch HIV-Antigenkontakt oder mikrobielle, opportunistischen Infektionen. In HIV-infizierten, ruhenden CD4-positiven-T-Zellen wird die DNA zunächst nur unvollständig synthetisiert und nicht in das zelluläre Genom eingebaut. Diese Zellen befinden sich in einem Zustand der latenten Infektion, wobei die Struktur der inkomplett umgeschriebenen

cDNA relativ labil ist (Zack et al., 1990). Solche latent infizierte T-Zellen, ebenso wie Monozyten / Makrophagen und Zellen des ZNS, stellen aber ein persistierendes Virusreservoir dar (u.a. Chun et al., 1997; siehe auch 4.4.3.).

Die integrierte, sogenannte provirale DNA ist eine genetisch stabile Struktur, die im Genom der Wirtszelle persistiert und nicht wieder ausgeschnitten werden kann. Sie dient als Matrize für die virale Transkription und Replikation, die LTRs enthalten Bindungsstellen für genregulierende Proteine, die die Expression der Virusgene kontrollieren (Janeway, 2002). Erst nach Aktivierung der infizierten CD4-positiven-T-Zellen kommt es zur Virusvermehrung und nach einer Latenzzeit zur Zellzerstörung. Zusätzlich existieren weitere Mechanismen, die zur Reduktion der Helferzellen beitragen, z.B. viral ausgelöste Immunreaktionen gegen CD4-Antigene oder Immunreaktionen gegen ansonsten normale CD4-positive Zellen, die HIV-Antigene gebunden haben (Mims et al., 1996). In Makrophagen / Monozyten, Langerhans-Zellen und interdigi- tierenden retikulären dendritische Zellen persistiert HIV meist ohne diese zu zerstören (Mims et al., 1996).

1.2.2. Krankheitsverlauf

Bei der Primärinfektion über Schleimhautkontakt (sexuelle Übertragung) infiziert HIV zuerst intraepithelial gelegene interdigi- tierende retikuläre dendritische Zellen bzw. Langerhans-Zellen. Diese Zellen können das HI-Virus an spezifische Rezeptoren binden (DC-SIGN) und transportieren es in dieser Form über die Lymphwege in die drainierenden Lymphknoten. Dort infiziert HIV Zellen im Keimzentrum und im Paracortex. Im weiteren Verlauf disseminiert der Erreger hämatogen in alle Lymphknotenstationen, in Organe, die Lymphfollikel enthalten, in das Knochenmark und in das zentrale Nervensystem (ZNS).

Diese Ausbreitung findet innerhalb der ersten Wochen statt und führt zu einer hohen Viruslast und einer großen Zahl infizierter CD4-positiver-T-Zellen im Blut. Es kommt zu einem kurzzeitigen Einbruch der T-Helferzellzahl. Diese erste Phase kann sich als mononukleoseähnliches Krankheitsbild mit Symptomen wie vorübergehendem Fieber, Unwohlsein, Lymphknoten- und Milzschwellung, Arthralgien, Myalgien, Pharyngitis und stammnahem Exanthem bemerkbar machen. In der Regel werden in den ersten Wochen Antikörper und zytotoxische T-Zellen gebildet, dieser Vorgang kann aber auch mehrere Monate beanspruchen. Damit findet zunächst, wie bei allen Virusinfektionen, eine gewisse Einschränkung der viralen Replikation statt. Die Virus-

last im Plasma sinkt um mehrere Größenordnungen, die Anzahl der infizierten Zellen in der Zirkulation nimmt ebenfalls ab. Dieser Zustand kann über längere Zeit, in einigen Fällen bis zu ca. 10 Jahre andauern. In dieser sogenannten asymptomatischen oder latenten Phase halten sich virale Produktion und Clearance die Waage. Hinter diesem Gleichgewichtszustand verbirgt sich allerdings eine konstante Fortsetzung der viralen Replikation und des Zellumsatzes in den Lymphknoten, die sich im Blut allerdings nicht unbedingt in dem Maße widerspiegelt (Pantaleo et al., 1993).

Die infizierte Person erscheint zunächst gesund. In einem späteren Stadium kommt es bei Nichttherapierten (oder beim Versagen einer Therapie) durch einen Anstieg der Virusreplikation und Verringerung der T-Helferzellen zur Ausbildung des AIDS Related Complex (ARC) mit Gewichtsverlust, Fieber, persistierender Lymphadenopathie und oft oraler Candidiasis und Diarrhoe (symptomatische Phase). Mit Fortschreiten der Virusreplikation bildet sich schließlich einige Jahre nach der Initialinfektion das Vollbild von AIDS, dem klinischen Endstadium, aus. Die Destruktion des Immunsystems durch den manifesten Mangel an T-Helferzellen spiegelt sich im Auftreten von erworbenen oder reaktivierten mikrobiellen opportunistischen Infektionen oder Tumoren wider (Coffin, 1995, Mims et al., 1996; Denner et al., 2002). Pathomorphologisch kommt es zur Auflösung der Lymphknotenarchitektur mit multiplem Zelluntergang. In Abb.1 ist der geschilderte Krankheitsverlauf schematisch dargestellt.

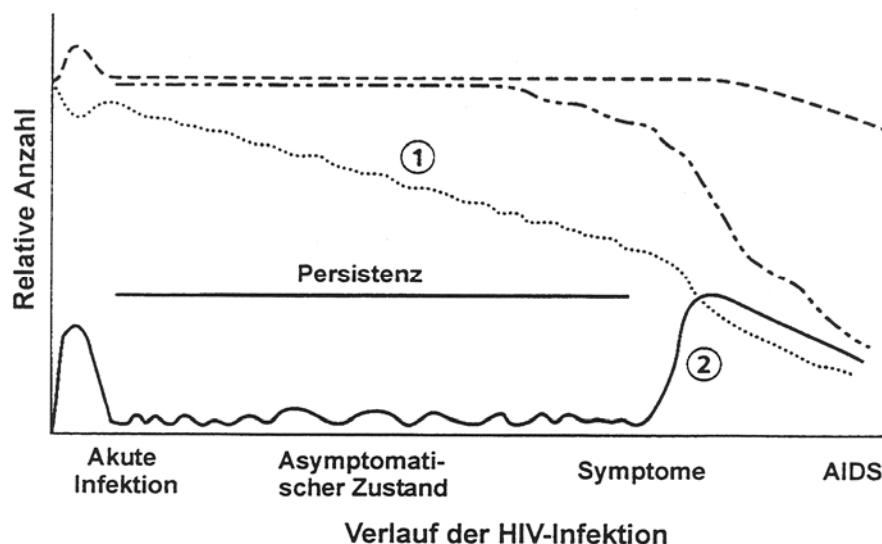


Abb. 1 Typischer Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion (nach Levy, 1998). Hierbei ist die relative Zahl der folgenden Parameter während des Verlaufs der HIV-Infektion dargestellt. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Viruslast im Blut, die gepunktete Linie die Zahl der CD4 positiven Zellen. Die gestrichelte Linie steht für die Zahl der CD8 positiven T-Zellen und die mit Punkten durchbrochene Linie zeigt die gegen HIV gerichteten zytotoxischen CD8 positiven Zellen. Phase 1 ist der Zeitraum der Latenzphase, Phase 2 steht für den Übergang zum Vollbild der Krankheit, AIDS

Das Center for Disease Control in Atlanta veröffentlichte 1993 ein Schema zur Klassifikation des Krankheitsstadiums der HIV-Infektion. In die CDC-Klassifikation fließen zum einen die Zahl der CD4-Lymphozyten der Patienten, zum anderen die klinischen Symptome mit ein:

Laborkategorie 1 bis 3

Ab 500 / μ l CD4-Lymphozyten

200 - 499 / μ l CD4-Lymphozyten

< 200 / μ l CD4-Lymphozyten

Klinische Kategorie A bis C:

Kategorie A

Asymptomatische HIV-Infektion

Persistierende generalisierte Lymphadenopathie (LAS)

Akute, symptomatische (primäre) HIV-Infektion

Kategorie B (u.a.)

Oropharyngeale und vulvovaginale, chronische bzw. schlecht therapierbare Candida-Infektion

Konstitutionelle Symptome wie Fieber über 38,5 °C oder länger als vier Wochen bestehende Diarrhö

Orale Haarleukoplakie

Herpes Zoster bei Befall mehrerer Dermatome oder nach Rezidiven in einem Dermatome

Periphere Neuropathie

Kategorie C (entspricht den AIDS-definierenden Erkrankungen)

Das sind im Wesentlichen alle ausgedehnten und oft kaum zu beherrschenden Infektionen mit bakteriellen Erregern (z.B. Pneumocystis jiroveci, Mykobakterium tuberculosis), Pilzen (z.B. Candida spp., Cryptococcus neoformans), Viren (z.B. Cytomegalie-Virus) und Parasiten (z.B. Toxoplasma gondii, Isospora belli, Kryptosporidien), daneben maligne Erkrankungen (z.B. maligne Lymphome), HIV-Enzephalopathie und Wasting-Syndrom.

(Quelle: www.hivinfo.de)

1.3. Antiretrovirale Therapie (ART)

Antivirale Strategien sind wesentlich schwieriger zu bewerkstelligen als z.B. antibakterielle Verfahren, da Viren nicht autonom replizieren, sondern die gesamte Zellmaschinerie des Wirts für ihre Replikation beanspruchen. Ein antivirales Agens darf aber niemals die Wirtszellaktivität blockieren. Deshalb gibt es relativ wenige effektive antivirale Therapien. Beispiele hierfür sind die Nukleosidanaloga Acyclovir und dessen Derivate gegen Herpes-simplex- und Varizella / Zoster-Viren, Ganciclovir gegen CMV, Lamivudin und Adefovir gegen Hepatitis B, eine Influenzatherapie mit Neuraminidasehemmern gegen die Virusfreisetzung bzw. -ablösung aus / von der Zelle (Tamiflu, Relenza) und die unten aufgeführten Inhibitoren gegen die HIV-kodierte Protease (PR) und die HIV-kodierte Reverse Transkriptase (RT). Gegen das Hepatitis C-Virus (HCV) wird das Nukleosidalogon Ribavirin eingesetzt, daneben werden neu entwickelte Proteaseinhibitoren gegen HCV geprüft.

1.3.1. Rolle der HIV-kodierten Enzyme Reverse Transkriptase und Protease

Derzeit existieren, wie oben erwähnt, zwei Klassen von Inhibitoren, die Schlüsselenzyme der retroviralen Replikation angreifen: Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase (RTIs) und Inhibitoren der viralen Protease (PIs). Zudem wurde 2003 ein Wirkstoff zugelassen, der die Fusion des HI-Virus mit der Zellmembran verhindert (Enfuvirtid).

1.3.1.1. Hemmer der Reversen Transkriptase (RT)

Wie eingangs beschrieben, transkribiert die virale RT die virusgenomische RNA in eine cDNA, die nach Infektion in das Wirtsgenom integriert wird und so für eine Persistenz der retroviralen Aktivität in der Wirtszelle und deren Tochterzellen sorgt. Eine selektive Inhibition der RT würde die Synthese von cDNA und somit alle sukzessiven folgeschweren Vorgänge unterbinden. Entsprechende Inhibitoren der Reversen Transkriptase waren als erste Medikamentengruppe verfügbar. Die ersten Substanzen waren Nukleosidanaloga-RT-Inhibitoren (NRTIs). Die NRTIs ähneln zellulären Nukleosiden, müssen aber, um wirksam zu sein, erst intrazellulär phosphoryliert werden. In der Zelle konkurrieren sie mit den nativen Nukleotiden. Da ihnen aber an der 3'-Position der Desoxyribose eine OH-Gruppe fehlt, kommt es bei deren Einbau in den wachsenden DNA-Strang zum Kettenabbruch (Coffin et al., 1997).

Von diesem Inhibitionsmechanismus unterscheiden sich die später eingeführten nicht nukleosidartigen RT-Inhibitoren (NNRTIs). Sie hemmen die RT nichtkompetitiv, indem sie an eine Stelle nahe dem katalytischen Zentrum der Polymerase binden, zu einer Konformationsänderung führen und so die Enzymaktivität blockieren (Kohlstaedt et al., 1992). NNRTIs müssen im Gegensatz zu den NRTIs nicht phosphoryliert werden (Joly and Yeni, 2000). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass diese Substanzklasse spezifisch auf HIV-1 Isolate der Gruppe M wirkt, während sie auf HIV-1 der Gruppe O und HIV-2 keinen wesentlichen hemmenden Effekt hat (Witvrouw et al., 1999).

Zwischen den zwei Untergruppen der Reversen Transkriptase Hemmer besteht kein Hinweis auf eine Kreuzresistenz. Da es bei einer Monotherapie von NNRTIs rasch zu einer Resistenzentwicklung kommt, werden sie nur im Rahmen von Kombinations-therapien angewendet. Dort erweisen sie sich als wirksame antiretrovirale Substanzen (z.B. D'Aquila et al., 1996). Die derzeit existierenden NRTIs und NNRTIs sind in Tab. 1 und 2 aufgelistet.

Freiname	Abk.	Handelsname	Hersteller
Zidovudin	AZT	Retrovir	GlaxoSmithKline
Lamivudin	3TC	Epivir	GlaxoSmithKline
/	AZT / 3TC	Combivir	GlaxoSmithKline
Abacavir	ABC	Ziagen	GlaxoSmithKline
/	3TC / ABC	Kivexa	GlaxoSmithKline
/	AZT / 3TC / ABC	Trizivir	GlaxoSmithKline
Didanosin	ddl	Videx	Bristol-Myers Squibb
Stavudin	d4T	Zerit	Bristol-Myers Squibb
Emtricitabin	FTC	Emtriva	Gilead Sciences
Tenofovir DF	TDF	Viread	Gilead Sciences
/	TDF / FTC	Truvada	Gilead Sciences

Tab. 1 Nukleosidanaloga (NRTIs) (Quelle: RKI / Juni 2005 / siehe Webseite 3)

Freiname	Abk.	Handelsname	Hersteller
Delavirdin	DLV	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn
Efavirenz	EFV	Sustiva / Stocrin	Bristol-Myers Squibb / Merck, Sharp & Dome
Nevirapin	NVP	Viramune	Boehringer Ingelheim

Tab. 2 Nicht nukleosidartige RT-Hemmer (NNRTIs) (Quelle:RKI/Juni 2005/siehe Webseite 3)

Die Einführung der nicht-nukleosidischen Hemmer der RT und der nachfolgend beschriebenen Protease-Inhibitoren (siehe 1.3.1.2.) führte zu einem Durchbruch in der HIV-Therapie, da erstmals synergistisch wirkende, potente Kombinationstherapien angewendet werden konnten. Diese Therapieform wird als hochaktive antiretrovirale Therapie, kurz HAART, bezeichnet.

Durch die Verwendung der Proteaseinhibitoren als Bestandteil einer Kombinationstherapie ab dem Jahr 1995/1996 kam es zu einer drastischen Senkung der Morbidität und Mortalität bei der HIV-Infektion (Palella et al., 1998; siehe Abb. 2). Eine weitere Studie bestätigt diesen Erfolg und stellt überdies eine Reduktion der Hospitalisationskosten fest (Lavalle et al., 2000).

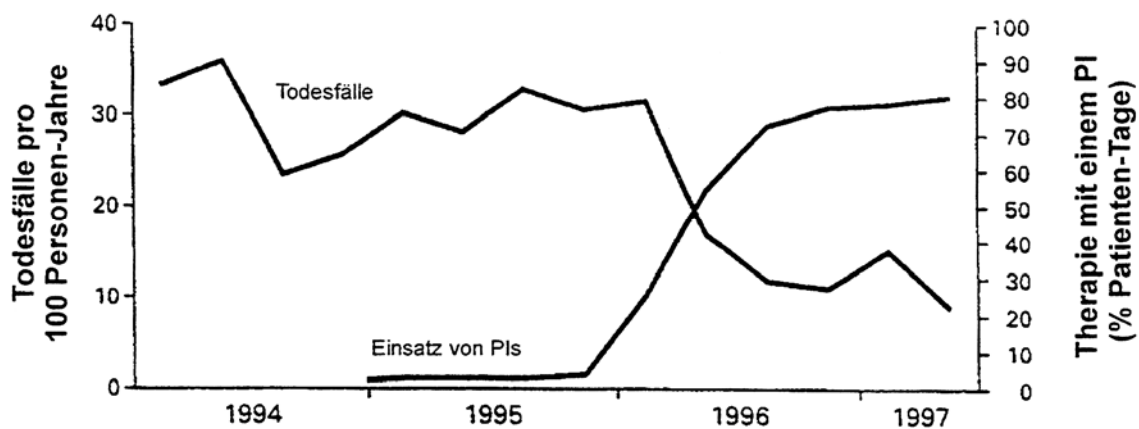


Abb. 2 Mortalität und die Frequenz der antiretroviralen Kombinationstherapie mit einem Proteaseinhibitor (Palella et al., 1998)

1.3.1.2. Hemmer der Protease (PR)

Die Substanzklasse der Proteaseinhibitoren wurde mit Hilfe der Kristallstruktur-Analyse der HIV-1-Protease entworfen (Coffin et al., 1997). Die Inhibitoren besetzen direkt das aktive Zentrum der viralen Protease. Sie ähneln den Peptidsubstraten des viralen Enzyms (Peptidomimetika), können allerdings nicht gespalten werden. Durch ihre Bindung im aktiven Zentrum blockieren sie die Proteaseaktivität. Deren essentielle Funktion für die Virusreifung ist im Unterpunkt 1.3.1.2.1. dargestellt. Die Zeit, die von der Entdeckung der Proteaseinhibitoren bis zu ihrer Einführung als antiretrovirale Medikamente verstrich, ca. 5 Jahre, ist eine der kürzesten in der modernen Pharmageschichte. Die Substanzen sind allerdings derart hydrophob, dass einige chemische Modifikationsschritte nötig waren, bis die Proteaseinhibitoren eine akzeptable orale Bioverfügbarkeit aufwiesen (Richman, 2001).

Es wurde festgestellt, dass die PIs die einzigen antiretroviralen Substanzen sind, die die Virusproduktion und -freisetzung aus chronisch-infizierten Makrophagen begren-

zen können (Aquaro et al., 2002). Diese Makrophagenpopulation bildet mit anderen Zellen und Kompartimenten das Reservoir von HIV im Körper, einer der Hauptgründe, weshalb HIV durch die gängige Therapie nicht eradiziert werden kann. Allerdings sind für die Hemmung der Virusproduktion in Makrophagen sehr hohe Medikamentenspiegel nötig, die nur schwer zu erreichen sind. Mangelnde Compliance, ein veränderter Metabolismus oder schlechte Resorption der PIs sind häufige Ursachen einer unzureichenden Wirkstoffkonzentration (Aquaro et al., 2002). Die derzeit verfügbaren PIs sind in Tab. 3 aufgeführt. Ein neuer Proteaseinhibitor, der im Oktober 2005 die Marktzulassung zur HIV-Kombinationstherapie von der Europäischen Kommission erhalten hat, ist Tipranavir. Die Besonderheit dieses Medikaments ist die Tatsache, dass es sich hier um den ersten nichtpeptidischen PI (NPPI) handelt.

Freiname	Abk.	Handelsname	Hersteller
Fosamprenavir	FPV	Telzir	GlaxoSmithKline
Atazanavir	ATV	Reyataz	Bristol-Myers Squibb
Indinavir	IDV	Crixivan	MSD Sharp & Dohme
Nelfinavir	NFV	Viracept	Hoffmann-LaRoche
Ritonavir	RTV	Norvir	Abbott
Lopinavir+Ritonavir	LPV/r	Kaletra	Abbott
Saquinavir	SQV	Invirase	Hoffmann-LaRoche
Tipranavir		Aptivus	Boehringer Ingelheim

Tab. 3 Proteaseinhibitoren [Quelle(ausgenommen Tipranavir):RKI / Juni 2005 / siehe Webseite 3]

1.3.1.2.1. *Eigenschaften und Rolle der Protease im Lebenszyklus des Virus*

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Resistenzbildung bei Anwendung von Inhibitoren gegen die HIV-1 Protease befasst, soll hier auf den Mechanismus der Proteaseaktivität eingegangen werden.

Bei der Transkription des integrierten HIV-Genoms, das sich in den „env“, „gag“ und „pol“ Genbereich aufteilt, entsteht zunächst immer eine virale RNA voller Länge, die durch die Kernmembran in das Zytoplasma migriert. Dort wird sie entweder translatiert oder von Kapsiden neu entstehender Viruspartikel umschlossen. Bei der Synthese der für die antivirale Therapie relevanten Ziel-Proteine PR und RT entstehen zunächst langkettige Vorläuferproteine (Pr55 bzw. Pr160) des gesamten gag bzw. durch frameshift des gag-pol Genes. Diese müssen in die funktionellen Proteine gespalten werden. Die HIV-Protease ist verantwortlich für diese Spaltung (Prozessierung) der Vorläuferproteine, die essentiell für die Virusreifung ist (siehe Abb. 3).

Strukturell ist die aktive HIV-1-Protease ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten aus jeweils 99 Aminosäuren. Sie gehört zur Familie der Aspartat-Proteasen (von der Helm, 1977; Toh et al., 1985, Seelmeier et al., 1988; von der Helm, 1996), zu deren Vertretern z. B. auch die beim Menschen vorkommenden Enzyme Pepsin und Renin zählen. Diese Enzymgruppe ist dadurch charakterisiert, dass sich im aktiven Zentrum zweimal das hochkonservierte Motiv Asp-Thr-Gly befindet. Im Fall der HIV-Protease steuert jede Untereinheit diese Aminosäuren an den Positionen 25 bis 27 zur Formation des katalytischen Zentrums bei (Weber et al., 1989). Am Prozess der proteolytischen Spaltung sind maßgeblich die beiden Asparaginsäuren beteiligt. Genetisch wird der monomere Teil der Protease auf einem 5' nahem Abschnitt innerhalb des viralen pol-Genes kodiert (Coffin et al., 1997; Peng et al.; 1989).

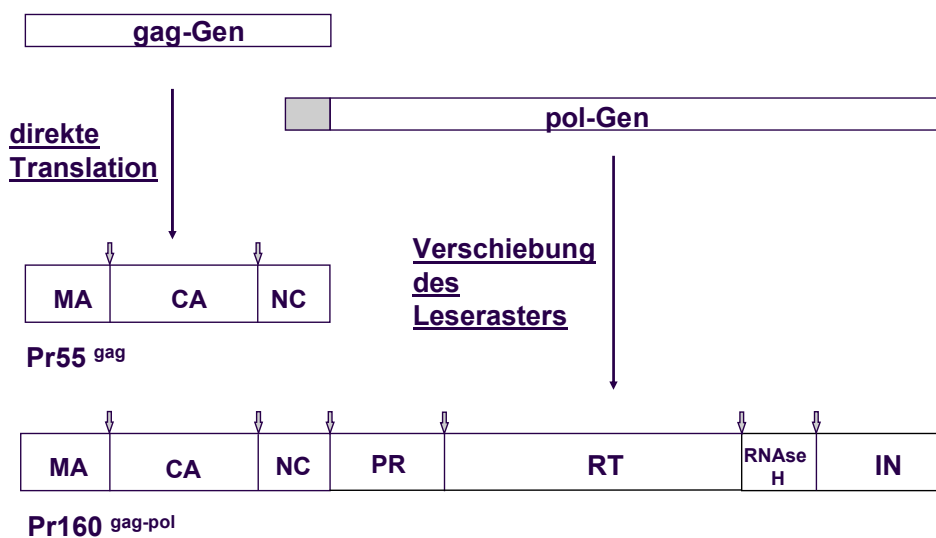


Abb. 3 Translationsprodukte des HIV gag und pol Leserasters MA = Virusmatrix; CA = Kapsid; NC = Nukleokapsid; PR = Protease; RT = ReverseTranskriptase; IN = Integrase, ↓ = Spaltstellen der Protease

Die proteolytische Spaltung findet vornehmlich zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten statt. Die bei der Translation der viruskodierten Proteine zunächst entstandenen, oben erwähnten langen Polyproteinketten sammeln sich an der inneren Zytoplasmamembran und sind noch so verdünnt, dass keine Spaltungsreaktionen stattfinden können. Erst während des Prozesses des sogenannten „buddings“ (Aussprossung des Viruspartikels aus der Zytoplasmamembran) und der damit verbundenen Konzentrierung der Substrate kommt es zu der in Abb. 3 veranschaulichten Prozessierung (Tomaselli et al., 2000). Die entstehenden, noch nicht infektiösen Partikel formieren sich in einem komplexen Prozess zur Virusmatrix (g17), zum Kapsid (g24) und Nukleokapsid (g7, g9) und schließen die HIV-RNA und die Enzyme

Protease, Reverse Transkriptase, RNase H und Integrase ein. Wie sich das Proteasemolekül primär, vermutlich durch einen autokatalytischen Prozess, selbst aus dem Pr160 Vorläuferprotein herauspaltet, ist noch nicht vollständig geklärt (Kotler et al., 1992, Phylip et al., 1992; Kaplan et al., 1994; Zybarth und Carter, 1995; Lindhofer et al., 1995).

Wird die Proteaseaktivität durch Inhibitoren blockiert, entstehen unreife Viruspartikel, die nicht in der Lage sind, neue Zellen zu infizieren (Kohl et al., 1988; Seelmeier et al., 1988; Peng et al., 1989). Proteaseinhibitoren sind deshalb potente Substanzen zur Hemmung der viralen Replikation.

1.3.2. Therapiestandard

Ziel der heutigen Therapieschemata ist eine maximale, lang anhaltende Suppression der viralen Replikation und eine damit verbundene Rekonstitution des Immunsystems mit Anstieg der T-Helferzellen und einer substantiellen Besserung des klinischen Zustandes des HIV-Patienten. Daneben wird angestrebt, dass Nebenwirkungen verringert und Therapien vereinfacht werden.

Die HIV-RNA-Kopienzahl, die im Blut gemessen wird, spiegelt die Replikationsaktivität des Virus im Körper wieder. Je höher die Replikationsrate, desto größer ist die Destruktion des Immunsystems und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in Anwesenheit von antiretroviralen Medikamenten Resistenzen ausbilden. Deshalb strebt es jedes Therapieregime an, die Viruslast so weit wie möglich zu senken. Von einer effektiven antiretroviralen Therapie wird erwartet, dass optimalerweise die Viruslast unter die Nachweisgrenze von derzeit 20-50 HIV-RNA-Kopien/ml sinkt und die CD4-Zellzahl wieder ansteigt.

Diesem Ziel kam man mit der Einführung der PIs und NNRTIs (siehe 1.3.1.1 und 1.3.1.2) und der damit verbundenen Kombinationsmöglichkeit mit NRTIs näher. Tatsächlich führte diese sogenannte hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) zu einer drastischen Senkung der Mortalität und Morbidität bei HIV-Patienten (Palella et al., 1998; Vittinghoff et al., 1999; Mocroft et al., 2003). Eine komplette Eradikation des Virus ist mit Hilfe der derzeit verfügbaren Medikamente allerdings äußerst unwahrscheinlich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass schon im Anfangsstadium der HIV-Infektion ein Pool an latent-infizierten Zellen mit stabil integriertem HIV-Provirus im Körper vorhanden ist, der von den antiretroviralen Substanzen nicht erreicht wird (Finzi et al., 1997; Pierson et al., 2000). Der ideale Zeitpunkt für den Beginn einer

Therapie ist umstritten, da bei der vermutlich lebenslang einzunehmenden Medikation die Nebenwirkungsprofile der einzelnen antiretroviralen Substanzen zum Problem werden können.

Die Therapieempfehlungen der vom Robert-Koch-Institut berufenen Expertenkommission sind in Tab. 4 zusammengefasst (Deutsch-österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, RKI 2005, siehe Webseite 3).

Klinisch	CD4 positive Lymphozyten / μ l	HIV-RNA / ml (RT-PCR)	Therapieempfehlung
HIV-assoziierte Symptome und Erkrankungen (CDC: C, B)	alle Werte		AI
Asymptomatische Patienten (CDC: A)	< 200	alle Werte	AI
	200 - 350	alle Werte	BII
	350 - 500	> 50.000 - 100.000 Kopien	BII
		< 50.000 Kopien	CIII
> 500	alle Werte	DIII	
Akutes retrovirales Syndrom	alle Werte	alle Werte	CII, bevorzugt in Studien

Tab. 4 Bewertungsbasis der Therapieempfehlung der Expertenkommission des RKI (RKI, 2005); AI: eindeutige Empfehlung; auf der Basis mindestens einer randomisierten Studie mit klinischen Endpunkten*; BII: im Allgemeinen ratsam; auf der Basis von Surrogatmarker-Studien (CD4-Zellzahl, Viruslast); CII: vertretbar; auf der Basis von Surrogatmarker-Studien; CIII: vertretbar; nach Expertenmeinung; DIII: im Allgemeinen abzulehnen; nach Expertenmeinung; *klinische Endpunktstudien werden aufgrund der geänderten Zulassungsbedingungen der FDA und EMEA für neuere Substanzen nicht mehr durchgeführt

Zurzeit werden folgende Kombinationsmöglichkeiten für die initiale Therapie angewandt:

Die Kombination eines Proteaseinhibitors (in der Regel „geboostet“; siehe 1.3.2.1.) mit zwei Nukleosid-Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

Die Kombination eines nicht-nukleosidartigen Reverse Transkriptase-Inhibitors (NNRTIs) mit zwei NRTIs

Die Kombination von drei NRTIs.

Die Entscheidung, welches Therapieregime geeignet ist, richtet sich neben der Viruslast und dem Krankheitsbild auch nach weiteren Erkrankungen des Patienten, nach der zusätzlichen Medikation und anderen individuellen Gesichtspunkten, z. B. der zu

erwartenden Compliance, das heißt der Bereitschaft des Patienten, sich an die Anweisungen des behandelnden Arztes zu halten. Die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Kombination zweier PIs bzw. Kombinationen aus PIs und NNRTIs sind noch nicht abschließend geklärt, auch liegen noch keine Informationen über die Langzeitverträglichkeit vor (Deutsch-österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, RKI 2005).

Trotz des erfolgreichen Einsatzes der neuen Therapieschemata gibt es zwei signifikante Probleme: a.) die Nebenwirkungen und b.) die Resistenzentwicklung, die sogar zu einem Therapieversagen führen kann.

1.3.2.1. Nebenwirkungsprofil der Proteaseinhibitoren

Wie bei allen wirksamen Medikamenten können auch bei der Einnahme von PIs Nebenwirkungen auftreten. Typische PI-induzierte Nebenwirkungen sind eine Störung des Fettstoffwechsels, die mit einer Hypertriglyceridämie und Hypercholesterinämie einhergeht und deshalb das Risiko für ein arteriosklerotisches Geschehen erhöht. Daneben wird dieser Medikamentengruppe die Beteiligung am sogenannten Lipodystrophie-Syndrom zugeschrieben. Darunter versteht man eine periphere Lipomatrophie kombiniert mit zentraler Adipositas. Prominent ist oft ein sogenanntes „Büffelnacken“. Allerdings scheinen auch die Reverse Transkriptase-Inhibitoren an dem Syndrom, das für die Patienten oft mit einem großen Leidensdruck verbunden ist, beteiligt zu sein (Carr et al., 2000; Nolan et al., 2001). Des Weiteren greifen PIs in den Glucosestoffwechsel ein und können zu Insulinresistenz und Diabetes mellitus führen. Möglich sind auch unspezifische Beschwerden wie Übelkeit und Diarrhoe.

Ein weiterer Nachteil der Proteaseinhibitoren ist deren ungünstige Pharmakokinetik mit relativ kurzen Plasma-Halbwertszeiten und mäßiger oraler Bioverfügbarkeit. Diese Tatsache machte es vor allem in der Vergangenheit erforderlich, dass eine große Medikamentendosis in relativ kurzen Zeitintervallen in Abstimmung mit den Mahlzeiten eingenommen werden musste. Mittlerweile arbeitet man aber an chemischen Modifikationsformen bereits gebräuchlicher PIs mit verbesserter Pharmakokinetik. Außerdem macht man sich den Effekt der sog. „Boosterung“ durch den PI Ritonavir zunutze. Mit diesem Ausdruck wird das Phänomen beschrieben, dass bei der Gabe einer niedrigen Dosis Ritonavir, die therapeutisch wenig wirksam ist, der Plasmaspiegel eines zusätzlich verabreichten Proteaseinhibitors angehoben wird. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass Ritonavir die CYP3A4-Enzyme des hepati-

schen Cytochrom P450-Enzymsystems hemmt. Dadurch steigen die Talspiegel des anderen PIs und in den meisten Fällen verlängert sich auch dessen Eliminations-Halbwertszeit. Ritonavir bewirkt so einen Anstieg der Plasmaspiegel von (Fos-) Amprenavir, Atazanavir, Indinavir, Saquinavir, Lopinavir und in eingeschränktem Maß von Nelfinavir. Auf diese Weise können die PIs ohne Verlust der antiretroviralen Aktivität in ihrer Dosis reduziert werden (Flexner, 2000; Moyle et al., 2001; van Heeswijk et al., 2001). Der neuere PI Atazanavir zeigt in bisherigen Studien keine Erhöhung der Blutfette und ist somit eine viel versprechende Alternative bei Patienten mit Fettstoffwechselstörungen unter PI-Therapie (Pillero, 2002; Pillero, 2004).

1.3.2.2. Resistenzentwicklung

Neben den Nebenwirkungen ist eine Resistenzentwicklung leider eine inhärente Begleiterscheinung der Medikamenteneinnahme.

Die Gründe für die Resistenzentwicklung sind vielfältig. Es finden sich äußere, pharmakologische Faktoren und virologische Ursachen.

1.3.2.2.1. Äußere, pharmakologische Faktoren

- Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung ist umso höher, je länger therapiert werden muss, im Fall der HIV-Infektion vermutlich lebenslang.
- Suboptimale Medikamentenspiegel führen zu einer unzureichenden Suppression der Virusreplikation. Eine ungünstige Pharmakokinetik antiretroviraler Medikamente kann dazu beitragen. Auch die Nahrungsaufnahme oder andere Medikamente können die Bioverfügbarkeit beeinflussen. Daneben existieren aber auch individuelle Faktoren (genetische Polymorphismen des Patienten), die zu einer niedrigeren Wirkstoffkonzentration führen als gewünscht (Richman, 2001).
- Auch zelluläre Faktoren wie die Aktion bestimmter Transporterproteine können zu einem erniedrigten intrazellulären Wirkstoffspiegel führen. Für PIs wurde hier das P-Glykoprotein MDR1 identifiziert (Lee et al., 1998), das auf der Plasmamembran verschiedener Zellen (z.B. Endothelzellen der Blut-Hirn- und Blut-Testes-Schranke, intestinale Epithelzellen, bestimmte CD4 positive Zellen) lokalisiert ist. Es wirkt, indem es diese Medikamente wieder aus der Zelle pumpt (Miller, 2001).
- Ein häufiges, schwerwiegendes Problem, das sich indirekt auf die Pharmakologie auswirkt, ist die mangelnde Compliance von Patienten, die dazu führt, dass Tabletten nur unregelmäßig, nicht in der richtigen Menge oder gar nicht eingenom-

men werden. Dieses Verhalten wird durch die zum Teil beträchtliche Menge an Tabletten, komplizierte Einnahmeverordnungen oder durch Nebenwirkungen der Medikamente begünstigt.

1.3.2.2.2. *Virologische Ursachen*

- Die Replikationsrate von HIV bei fehlender oder unwirksamer antiretroviraler Therapie ist außergewöhnlich hoch. Es wird angenommen, dass HIV-1 in einem Jahr zwischen 140 und 300 oder mehr Replikationszyklen durchläuft (Coffin, 1995; Perelson et al., 1996), da die durchschnittliche Lebensdauer einer produktiv-infizierten CD4 positiven T-Zelle mehrere Tage beträgt (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995; Perelson et al., 1996).
- Die Fehlerrate der HIV-1 Reversen Transkriptase bei der Synthese des DNA-Stranges ist höher als bei anderen Viren, da sie nicht über eine Lesekontrolle und Korrekturmechanismen verfügt. Pro Replikationszyklus liegt die Mutationsrate zwischen 10^{-5} und 10^{-4} Mutationen pro Basenpaar, wobei am häufigsten der Basenaustausch vorkommt, gefolgt von Mutationen des Leserasters (Mansky and Temin, 1995; Coffin, 1995). Aufgrund der Genomgröße von HIV (ca. 10^4 Basenpaare) und der Tatsache, dass während der Latenzperiode pro Tag mindestens 10^9 CD4-Lymphozyten neu infiziert (Ho et al., 1995) bzw. mindestens 10^{10} Virionen insgesamt neu gebildet werden (Perelson et al., 1996), kann davon ausgegangen werden, dass jede mögliche Punktmutation innerhalb des HIV-Genoms, die mit einer Resistenz assoziiert ist, während eines Tages entsteht (Coffin, 1995). Varianten mit Doppel- und Mehrfachmutationen innerhalb eines Genoms kommen dagegen seltener vor. Die Mutationen führen zu einer veränderten Abfolge der Codons mit (in vielen Fällen) konsekutiver Änderung der Aminosäuresequenz der Proteine. Durch die hohe Replikations- und Mutationsrate entstehen genetisch unterschiedliche, in ihrer Replikationsfähigkeit vergleichbare Virusvarianten, die auch als Quasispezies bezeichnet werden (Coffin, 1995).
- Zudem finden zwischen den HI-Viren Rekombination statt (Robertson et al., 1995; Diaz et al., 1995; Cornelissen et al., 1996; Cornelissen et al., 1997).
- Unter den beschriebenen Virusmutanten existieren solche, bei denen die antiretroviralen Medikamente keine inhibitorische Wirkung mehr zeigen. In Gegenwart eines Reverse Transkriptase- oder Protease-Inhibitors besitzen diese Varianten einen Replikationsvorteil gegenüber empfindlicheren Virussubpopulationen.

Sie werden daher als „resistent“ bezeichnet. Durch die medikamentöse Selektion fixiert sich diese Mutation. Die diese Mutation beherbergende Variante wird zur dominanten Spezies (Drake, 1993).

- Als relativ neue Problematik wird die zunehmende Übertragung von resistenten HIV-Stämmen beobachtet. Eine Studie des Robert-Koch-Institutes mit aservierten Proben des Zeitraums 1996 - 1999 ergab eine allgemeine phänotypische Resistenz von 13 %, wobei diese eher schwach ausgeprägt war und sich hauptsächlich auf NRTIs bezog (Duwe et al., 2001). In einer weiteren Studie zur Klärung der Prävalenz resistenz-assoziiierter Mutationen wurden 2001 / 2002 184 therapie-naive HIV-Patienten in Nordrhein-Westfalen untersucht. Die Studie ergab bei der genotypischen Resistenztestung eine allgemeine Prävalenz von 14 %. Für die PIs war das Auftreten resistenz-relevanter Primärmutationen mit 2,1 % am geringsten, während die klinisch kaum bedeutsamen Sekundärmutationen mit über 80% sehr häufig anzutreffen waren (Oette et al., 2004). Eine europäische Studie ermittelte ähnliche Werte: ca. 10 % aller untersuchten therapie-naiven Patienten aus 19 europäischen Ländern wiesen mindestens eine Resistenzmutation auf, wobei bei kürzlich infizierten die Rate mit 13,5 % wesentlich höher war als bei chronisch infizierten (8,7 %) (Wensing et al., 2005).

1.4. Verfahren zur Resistenztestung

Ein Indikator des Therapieversagens ist ein Anstieg der Viruslast als Zeichen einer gesteigerten viralen Replikation. Diese führt zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktion durch Abfall der T-Helferzellen und damit zu einer Verschlechterung des klinischen Zustandes. Es ist deshalb erforderlich, Resistenzen durch Resistenztestungen so früh wie möglich festzustellen, um den Patienten auf ein wirksames Therapie-regime umzusetzen. Eine Resistenztestung ist auch vor dem initialen Therapiebeginn zur Klärung der Frage von Nutzen, welche Medikamente gemieden werden müssen (Sax et al., 2005). Die Abwesenheit von Resistenz lässt allerdings nicht zwingend auf eine dauerhafte Wirksamkeit des untersuchten Medikaments schließen, da die unter dem Selektionsdruck dominierende Virusvariante nicht die Gesamtheit des HIV-Pools darstellt. Minorpopulationen, wie in 1.3.2.2.2 angeführt, können dem Resistenztest entgehen.

Für die Notwendigkeit von Resistenztestungen sprechen mittlerweile mehrere prospektive Studien (Durant et al., 1999; Baxter et al., 2000; Cignolani et al., 2002; Cohen et al., 2002; Wegner et al., 2004).

Zur Diagnostik der Resistenzsituation der zirkulierenden Viruspopulationen eines HIV-positiven Patienten werden momentan zwei Methoden eingesetzt: der genotypische und der phänotypische Resistenztest.

1.4.1. Genotypische Testverfahren

Bei den genotypischen Resistenztestungen wird die Empfindlichkeit gegenüber einem bestimmten Medikament nur *indirekt* bestimmt. Mit Hilfe dieser Verfahren werden resistenzassoziierte Mutationen in den Zielproteinen der Inhibitoren, d.h. den RT- bzw. PR-kodierenden Regionen des Virusgenoms (RNA oder cDNA) detektiert. Der Nachweis dieser Mutationen erfolgt entweder über bestimmte Hybridisierungsverfahren oder über direkte Nukleotid-Sequenzierung der RT- und PR-kodierenden Region, deren Basenfolge mit der des Wildtyp-Virus verglichen wird. Die Grundlage der Interpretation des Genotyps ist der Vergleich mit dem dazugehörigen Phänotyp. Entsprechende Daten wurden über in-vitro Selektionsstudien in Zellkulturen, klinische Beobachtungen und parallele Messung mit einem phänotypischen Testverfahren gewonnen. Zur Beurteilung der Resistenzprofile werden mittlerweile zusätzlich auch online Datenbanken (z.B. Stanford-Database; geno2pheno) herangezogen. Der Vorteil der Genotypisierung liegt in seiner relativ schnellen und einfachen technischen Durchführbarkeit. Zudem ist dieser Test im Vergleich zur Bestimmung des Phänotyps die preiswertere Alternative.

Ein Problem der Genotypisierung besteht darin, dass gerade komplexe Mutationsmuster schwer zu interpretieren sind und stark von der Routine und Erfahrung des Beurteilers abhängen. Bei neu eingeführten Medikamenten ist die Korrelation zur phänotypischen Datenlage zudem oft noch so dürftig, dass keine oder nur sehr unsichere Aussagen getroffen werden können. Da die Erkenntnisse über bestimmte Mutationen und deren Einfluss auf die Wirksamkeit einzelner antiretroviraler Medikamente zum Teil über Studien unter Monotherapie gewonnen wurden, kann der Transfer dieser Daten bei tatsächlicher Gabe einer Kombinationstherapie problematisch sein.

1.4.2. Phänotypische Testverfahren

Die phänotypische Resistenzbestimmung ist eine direkte Messung der Medikamentenempfindlichkeit. Dabei wird entweder die Hemmung der viralen Replikation oder die Hemmung der Enzymaktivität der Reversen Transkriptase / Protease in Anwesenheit einer antiretroviralen Substanz gemessen.

Die auf Replikation basierenden Assays werden mit rekombinanten Viren im Zellkultursystem durchgeführt. Meist werden die Sequenzbereiche des pol-Genes, die für die RT / PR-Region der Patienten kodieren, mittels PCR amplifiziert und über homologe Rekombination in einen RT / PR-deletierten proviralen HIV Laborklon eingebracht und in Zellkultur repliziert (= Recombinant Virus Assay / RVA). Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine PBMC-Kultur mit dem vollständigen Virusisolat des Patienten zu infizieren. In beiden Fällen wird mit Verdünnungsreihen des zu testenden antiretroviralen Medikaments dann die Replikationsaktivität des Virus (z. B. durch Quantifizierung des produzierten p24 Antigens) gemessen (Garcia-Lerma und Heneine, 2001). Alle bisher kommerziell angebotenen phänotypischen Resistenztests basieren auf dieser Methodik.

Ein Nachteil der auf Replikation basierenden phänotypischen Resistenzassays ist der Umgang mit vermehrungsfähigen Viren bzw. Plasmiden. Deshalb sind bei diesen Testsystemen hohe Sicherheitsvorkehrungen zum Infektionsschutz des Laborpersonals nötig (S3-Bedingungen). Außerdem ist die Durchführung dieser Methode sehr zeitaufwändig (2-4 Wochen) und kostenintensiv. Kritisch muss man auch die Übertragung der unter unnatürlichen Wachstumsbedingungen gewonnenen Ergebnisse auf die komplexe Situation im menschlichen Körper sehen. Extensive Kokultivierung kann zu einer Änderung des Resistenzmusters des kultivierten HIV-Stammes führen, die die Resistenzsituation verfälscht (Debiaggi et al., 2002).

Enzymatische Resistenztests gehen anders vor: RT-Resistenztests benutzen ein definiertes RNA-Template, aus dem mittels RT-Aktivität c-DNA gebildet wird. Die c-DNA wird nach Amplifikation z. B. durch eine auf ELISA-basierende Hybridisation detektiert (Garcia-Lerma und Heneine, 2001). Die für die enzymatische Resistenztestung der HIV-Protease etablierte Methode, die in dieser Doktorarbeit angewandt wurde, wird in 1.4.3 beschrieben.

Alle phänotypischen Tests bestimmen die Substanzkonzentration, bei der 50 % bzw. 90 % der viralen Replikation oder der Enzymaktivität gehemmt werden (inhibitory concentration₅₀ / IC₅₀ bzw. inhibitory concentration₉₀ / IC₉₀). Die Ergebnisse werden

mit den entsprechenden IC_{50} bzw. IC_{90} -Werten des Wildtyps verglichen. Aus den Quotienten ergeben sich die Resistenzfaktoren. Diese Werte sind für den Kliniker leichter verständlich als genotypische Resistenzprofile. Trotzdem können auch diese Werte noch nicht abschließend beurteilt werden, da klinische Schwellenwerte (sogenannte „cut-offs“), die zwischen sensitiv, intermediär-resistent und resistent unterscheiden, bisher nicht klar definiert sind (Rusconi, 2000; García-Lerma und Heneine, 2001; Haubrich et al., 2005).

Ein Vorteil der phänotypischen Methode liegt darin, dass es sich, wie oben bereits erwähnt, um eine direkte empirische Messung handelt, so können auch komplexe Resistenzmuster beurteilt werden. Dies spielt vor allem bei Proteaseinhibitoren eine Rolle, da trotz intermediärer Resistenzlage noch eine Wirksamkeit vorhanden sein kann (Richman, 2004). Besonders geeignet ist der phänotypische Resistenztest auch zur Bestimmung der Resistenzlage bei neuen antiretroviralen Medikamenten, über die oft noch keine ausreichenden Informationen über Resistenzmutationen vorliegen. Daneben können auch neue Resistenzmuster gegenüber bereits etablierten antiretroviralen Substanzen detektiert werden (Richman, 2004; Shafer and Schapiro, 2005).

Bisher durchgeführte Studien, die den Einsatz geno- und phänotypischer Verfahren miteinander verglichen, kamen zu unterschiedlichen Aussagen: Bei Patienten mit limitierten therapeutischen Optionen konnte neben der Genotypisierung kein zusätzlicher Wert der phänotypischen Testung gezeigt werden (Dunn et al., 2005). Eine weitere Untersuchung sah einen leichten Vorteil der phänotypischen Resistenztestung bei Patienten mit resistenteren Virusvarianten (Haubrich et al., 2005). Bei Patienten mit Therapieversagen und der Verwendung von Nevirapin, Efavirenz bzw. Abacavir als Bestandteil einer HAART konnte in einer anderen Untersuchung nachgewiesen werden, dass die phänotypische Resistenztestung bei der Interpretation unklarer genotypischer Daten hilfreich sein kann (Ochoa et al., 2005).

1.4.3. Beschreibung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Methode

Der in der vorliegenden Arbeit angewandte, enzymatische phänotypische Resistenztest (Gehring, 2001), der am Max-von-Pettenkofer Institut entwickelt wurde, beruht auf der rekombinanten Expression der HIV-1 Protease aus HI-Viren von Patienten in *E. coli* (von der Helm et al., 1994). Nach deren Herstellung und Aufreinigung wird die

Proteaseaktivität (im Reagenzglas) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Proteaseinhibitoren bzw. ohne Inhibitor gemessen.

Zur Gewinnung des viralen Enzyms wird aus Patientenblut entweder virale RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben oder DNA aus infizierten PBMCs des Patienten gewonnen. Der PR-kodierende Genabschnitt wird mittels PCR amplifiziert und in einen Vektor inkloniert. Dieses Konstrukt wird in E. coli-Zellen transformiert und dort exprimiert. Das so produzierte Enzym wird mit Hilfe einer raschen Ein-Schritt-Reinigung aus den Bakterienzellen isoliert. Ein entscheidender Schritt bei dieser Aufreinigung ist die Fällung mit Salzsäure, durch die die HIV-Protease im Gegensatz zu praktisch allen anderen im Ansatz vorhandenen Proteinen nicht irreversibel denaturiert wird. Nach Neutralisation und Aufkonzentrierung ist das Enzym wieder vollständig rekonstituiert und die Enzymaktivität kann gemessen werden. Mittlerweile wurde die HIV-Protease außerdem erfolgreich mittels eines kommerziellen in-vitro Transkriptions- / Translations-Testsystems exprimiert, was eine weitere Verbesserung der Testprozedur bedeutet (Hoffmann et al., 2005). Für die Ermittlung der Proteaseaktivität kommen zwei Detektionssysteme in Frage: Eine Ein-Punkt-Messung mit Hilfe der „Reversed Phase“-Chromatographie und eine kinetische Messung mit einem fluoreszierenden Substrat, die auch in der Arbeitsgruppe am Max-von-Pettenkofer Institut entwickelt wurden.

Die einzelnen Schritte sind im Material und Methoden-Teil erklärt und beschrieben. Diese enzymatische Methode hat gegenüber den auf Replikation beruhenden phänotypischen Zellkulturassays den entscheidenden Vorteil, dass (bis auf die Nukleinsäureextraktion) nicht mit infektiösem Material gearbeitet werden muss. Zeitaufwändiges Arbeiten im Zellkultursystem entfällt, Resistenzergebnisse können innerhalb einer Zeitspanne von einer Woche generiert werden und die errechneten Kosten sind wahrscheinlich geringer als beim Zellkultursystem.

1.5. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Bisher wurden die mit dem in 1.4.3. beschriebenen phänotypischen enzymatischen Verfahren produzierten HIV-Proteasen meist aus DNA infizierter PBMCs aus Patientenblut gewonnen, rekombinant exprimiert und die Enzymaktivität jeweils anschließend chromatographisch gemessen (Gehring, 2001). In einem kleineren Teil der Fälle wurde aber auch virale RNA aus Blutplasma, umgeschrieben in cDNA, herangezogen. Bei zwei Patienten deutete ein Vergleich von DNA vs. RNA als Ausgangs-

material der HIV-Protease im Rahmen der früheren Experimente darauf hin, dass bei hoher Viruslast von Patienten eine Übereinstimmung der Resistenzprofile besteht. Daraus wurde vorerst der Schluss gezogen, dass es ausreicht, die Analysen mit der einfacher zu handhabenden DNA durchzuführen (Gehring, 2001). Allerdings wurde damit die grundsätzliche Frage, ob nämlich in anderen Fällen Unterschiede zwischen DNA- und RNA-Resistenz eines Patienten vorliegen könnten, nicht beantwortet. Bei der vorliegenden Arbeit ging es deswegen vorrangig um die Klärung der Frage, ob die frühere Schlussfolgerung grundsätzlich bei allen Patienten gerechtfertigt ist oder ob es Patienten gibt, bei denen Unterschiede in der phänotypischen Resistenz zwischen HIV-1 RNA und PBMC-DNA der gleichen Blutprobe vorkommen, d.h. ob die aktuelle virale RNA möglicherweise Sequenzunterschiede gegenüber der vor vielleicht längerer Zeit integrierten proviralen DNA aufweist. Dabei sollten patientenspezifische Daten wie die Höhe der Viruslast und die Zahl der CD4-positiven Zellen in die Interpretation miteinbezogen werden, um so eine eventuelle Korrelation mit dem Auftreten bzw. dem Fehlen von Unterschieden in der phänotypischen Resistenz darzustellen. Ebenso sollten Erkenntnisse der viralen Dynamik bei der Ergebnisinterpretation Beachtung finden.

Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit international publizierten Daten gaben auf die Fragestellung keine befriedigende Antwort, weil sie teilweise konträr in ihren Aussagen waren (Kroodsma et al., 1994; Wei et al., 1995; Kaye et al., 1995 vs. Schapiro et al., 1996 vs. Gunthard et al., 1998; Koch et al., 1999; Devereux et al., 2000). Außerdem wurden diese Daten ausschließlich mit Hilfe genotypischer Methoden ermittelt. Deshalb wurde angenommen, dass gerade die Anwendung eines phänotypischen Resistenztestes, der ja den direkten Resistenzgrad bestimmt, besser interpretierbare Ergebnisse liefern könnte.

Weiterhin ging es in der vorliegenden Arbeit um die Klärung der experimentellen Frage, welches der beiden zunächst benutzten, unterschiedlichen Testsysteme zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Protease am zweckmäßigsten angewandt werden sollte. Es standen die ursprünglich verwendete RPC (Gehring, 2001) und ein kurz darauf neu entwickeltes kinetisches Fluoreszenztestsystem zur Verfügung (Hoffmann, 2002). Durch vergleichende Messungen der Proteaseaktivität mit Hilfe der beiden Testsysteme sollte das sensitivere für die zu lösende Problematik ausgewählt werden.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollte abgeleitet werden, welches Untersuchungsmaterial für die Durchführung des phänotypischen Resistenztestes am geeignetsten ist:

- Virale RNA aus Patientenplasma oder
- HIV-DNA aus PBMCs, aus Vollblut der Patienten extrahiert.

Das wichtigste Ziel bei der Festlegung des Ausgangsmaterials sollte sein, die tatsächliche Resistenzsituation des Patienten abzubilden, um dem Arzt eine wirksame (aktuelle) Hilfe zur Therapiesteuerung zur Verfügung stellen zu können. Da dieser Test in die Routinediagnostik aufgenommen werden sollte, war es auch anzustreben, den Test mit möglichst geringem Aufwand und ohne unnötige Infektionsgefahr für das Personal durchführen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Bezugsquellen

2.1.1. HIV-Isolate

HIV-Isolat	Referenz / Bezugsquelle
MVPMVP899-87-87 WT	Gürtler et al., 1994
WT aus p64	Seelmeir, MvP

2.1.2. E. coli

Bakterienstamm	(relevanter) Genotyp	Bezugsquelle
E. coli TG1	supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5 (rk- mk-) [F' traD36 proAB lacIq Δ M15]	Stratagene, Heidelberg

2.1.3. Medien

(die Prozentangaben beziehen sich auf die Endkonzentration in den Lösungen)

2.1.3.1. Für die Anzucht von E.coli

LB-Medium (pH 7,2)

Bacto-Trypton	1,0 %
Bacto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %

Zusätze für Agarplatten:

Bacto-Agar	1,5 %
Ampicillin	100 μ g / ml

2.1.3.2. Für die Anzucht elektrokompeter Zellen

SOB-Medium (pH 6,8-7,2)

Bacto-Trypton	2 %
Bacto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Nach dem Autoklavieren hinzufügen:

MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

SOC-Medium

SOB-Medium

Glucose 20 mM

2.1.4. Lösungen und Puffer

Ammoniakalische Silbernitratlösung

Ethanol 15 % (v/v)

NaOH 17,7 mM

NH₃ 0,44 % (v/v)

ad 100 ml

0,9 g AgNO₃ in 4 ml Ampuwa-H₂O lösen, langsam tropfenweise zugeben

Anodenpuffer (Tricin-SDS-PAGE, Schägger und von Jagow, 1987)

Tris 32 mM

Mit HCl konz. auf pH 8,9 einstellen

Entfärbelösung (Silberfärbung)

Ethanol 10 % (v/v)

Essigsäure 5,0 % (v/v)

Entwickler (Silberfärbung)

Zitronensäure 10 %

Formaldehyd 0,037 % (v/v)

Ethanol 10 % (v/v)

Fixativ (Silberfärbung)

Glutaraldehyd 1 %

NaHCO₃ 0,2 MGelfixer (Silberfärbung)

Methanol 50 % (v/v)

Essigsäure 10 % (v/v)

Geltrocknungslösung

Ethanol 20 % (v/v)

Glycerin 10 % (v/v)

Hämolysepuffer

Bezugsquelle: Argene Biosoft, Varilhes, France 20-fach konzentriert; aus „CINA-Kit“ (Nr. 19-002)

Kathodenpuffer (Tricin-SDS-PAGE, Schagger und von Jagow, 1987)

Tris 16 mM
Tricin 16 mM
SDS 0,55 mM; pH 8,2

Lösungen für die Aufarbeitung der HIV-1 ProteaseLösung 1:

Na-Acetat pH 5,5 50 mM
DTT 5 mM
EDTA 1 mM
Glycerin 15,0 % (v/v)

Lösung 2:

Na-Acetat pH 5,5 0,5 M
DTT 5 mM
EDTA 1 mM
Glycerin 15,0 % (v/v)

PBS-Puffer (Sambrook et al., 1989)

NaCl 137 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ 10 mM
KH₂PO₄ 1,8 mM
pH 7,4

RNA-Lösung

Herstellung einer RNA-Lösung mit RNase freiem Aqua dest.(10 mg / ml). Sie wurde anschließend im Heizblock für 15 min. bei 60 °C inkubiert, um evt. vorhandene DNAsen zu zerstören und die RNA möglichst vollständig zu lösen. Dann wurde die konzentrierte RNA-Lösung 1 : 5 mit RNase-freiem Aqua dest. verdünnt und nochmals für 45 min. bei 60 °C im Heizblock inkubiert.

RNase-freies Wasser (Sambrook et al., 1989)

DEPC 0,1 %

2 h bei Raumtemperatur inkubieren, 15 min. aufkochen

RPC-Puffer (RPC-Analyse):A11:

TFA 0,065 %

B1:

TFA 0,05 %
 Acetonitril 80 %

Beide Puffer wurden in entgastem Ampuwa-Aqua dest. gelöst.

4xSEB (SDS-PAGE)

TrisHCl pH 6,8 91 mM
 Glycerin 7,3 % (v/v)
 SDS 1,8 %
 2-Mercaptoethanol 2,6 M

Bromphenolblau bis zu einer mittelblauen Färbung zugeben

50x TAE (Sambrook et al., 1989)

Tris 2 M
 Essigsäure 5,7 % (v/v)
 EDTA (pH 8,0) 50 mM

2.1.5. Chemikalien

Aqua dest.:

Für wässrige Lösungen der unten aufgeführten Substanzen wurde gereinigtes Wasser der Reinstwasseranlage (Firma Memtech, Morenweis) des Max-von-Pettenkofer Institutes verwendet.

Für die molekularbiologischen, proteinbiochemischen und alle weitere Ansätze mit hohem Reinheitsanspruch wurde steriles, bidestilliertes Wasser verwendet („Ampuwa“, Firma Fresenius, Bad Homburg).

Bezeichnung	Abk.	Formel	Bezugsquelle
Acetonitril		C ₂ H ₃ N	Biomol, Hamburg
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %		C ₃ H ₅ NO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agar (Bacto-)			Difco, Detroit, Michigan, USA
Agarose (SeakemLE)			BMA, Rockland, ME, USA
Ammoniaklösung 32 %		NH ₃	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid		NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat		(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Ampuwa-Aqua destilliert			Fresenius, Bad Homburg

Hexadecyltrimethylammoniumbromid	CTAB Sigma H5882		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Citronensäure-Monohydrat		C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	DEPC		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	DMSO	C ₂ H ₆ OS	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat		Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100 %		CH ₃ COOH	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	EtOH	C ₂ H ₅ OH	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrilotetraessigsäure	EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung min. 37 %		CH ₂ O	Merck, Darmstadt
D-Glucose-Monohydrat		C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Glycerin		C ₃ H ₈ O ₃	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt (Bacto-)			Difco, Detroit, Michigan, USA
Isopropanol (2-Propanol)		C ₃ H ₈ O	Merck, Darmstadt
Lactose-Monohydrat		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat		MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat		MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat		C ₂ H ₃ O ₂ Na x 3 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid		NaCl	Merck, Darmstadt
Salzsäure		HCl	Merck, Darmstadt
Silbernitrat		AgNO ₃	Biomol, Hamburg
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin TEMED		C ₆ H ₁₆ N ₄	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tricin		C ₆ H ₁₃ NO ₅	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure		C ₂ HF ₃ O ₂	Merck, Darmstadt
Trypton (Bacto-)			Difco, Detroit, Michigan, USA

2.1.6. Besondere Chemikalien

Bezeichnung	Konz. der Stammlösung	Bezugsquelle
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg / ml in H ₂ O	Biomol, Hamburg
PCR-Nukleotid-Mix	(je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer / Roche, Mannheim
RNA (aus Torula Yeast, Typ VI)	2 mg / ml in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Terminator Ready Rxn Mix with AmpliTaq FS ("T-Mix")		Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Pufferlösungen zur Kalibrierung des pH-Meters (pH 4,01 / 7,00)		Mettler-Toledo GmbH, Steinbach

2.1.7. Enzyme

Bezeichnung	Konz. / Akt. der Stammlösung	Bezugsquelle
AmpliTaQ-Polymerase	5 U / µl	Perkin Elmer, Weiterstadt
AmpliTaQGold-Polymerase	5 U / µl	Perkin Elmer, Weiterstadt
Benzonase	> / = 250 U / µl	Merck, Darmstadt
Lysozym	20 mg / ml in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Restriktionsenzyme: BamHI HindIII	40 U / µl 40 U / µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Reverse Transkriptase (RT) (SuperScript II RNaseH Reverse Transkriptase)	200 U / µl	Invitrogen life technologies, Karlsruhe / Carlsbad, California
T4 DNA-Ligase	1 U / µl	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.8. Besondere Materialien und Testkits

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Gene Pulser Küvetten	Elektroporation	BioRad, München
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Isolierung der viralen DNA / RNA aus 400µl Serum/ Leukozyten Suspension	Boehringer / Roche, Mannheim
Küvetten ½ Mikro PMMA	Enzymkinetische Messungen	Mueller Ratiolab, Dreieich-Buchschlag
Mikrotiterplatten 96 well, PP, schwarz	Enzymkinetische Messungen	Nunc, Wiesbaden
Nucleobond AX 20	Minipräparation von Plasmid-DNA zur Kontrolle des Elektroporationserfolgs	Macherey und Nagel, Düren
Nucleobond PC 100	Midipräparation von Plasmid-DNA	Macherey und Nagel, Düren
„PCR tubes“		Perkin Elmer Deutschland, Überlingen
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Elution von DNA aus Agarosegel, Aufreinigung Restriktions- Ansätze	Qiagen, Hilden

2.1.9. Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM DNA Sequencer 977 einschl. Software	Perkin Elmer, Weiterstadt
ÄKTA design systems einschl. Software	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Brutschrank B 10	Memmert, Schwabach
Elektrophorese: Agaroseelektrophoresekammern einschl. Zubehör Proteinelektrophoresekammer E 5514 einschl. Zubehör	bts, St. Leon Roth Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Geldokumentationsgerät E.A.S.Y. Win 32	Herolab, Wiesloch
Gene Pulser Apparat II	BioRad, München
Heizblock Grant QBT	Bachhofer, Reutlingen
Küvettenfluorometer SM25	Biotek Kontron, Neufahrn
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotiterplatten-Lesegerät: FI 600 Microplate Fluorescence Reader	Biotek Kontron, Neufahrn
Mikrowellen-Gerät Micro-Chef FM B930	Moulinex, Solingen
PCR-Cycler: UNO II Silver Thermocycler Thermocycler 9600	Biometra, Göttingen Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Meter pH 526 MultiCal	Bachhofer, Reutlingen
Photometer Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten: Gilson Eppendorf Glaspipetten, autoklavierbar	ABIMED, Langenfeld Eppendorf, Hamburg Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Spektralfluorometer SFM25	Biotek Kontron, Neufahrn
Spektralfluorometer Fluoro Max?	Spex Industries, Edison New Jersey, U-SA?
Sterilbank Laminar Flow	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Sysmex, Gerät zur Zellzahleinstellung	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Trocknungsrahmen für SDS-Gele	Roth, Karlsruhe
Ultraschallgerät Branson Sonifier B-15	Bachhofer, Reutlingen
Vakuumpumpe MP 18 N	Bachhofer, Reutlingen
Vortex-2 Genie	Bachhofer, Reutlingen
Waage Ohaus Precision Advanced Electronic Balance GT400	Bachhofer, Reutlingen
Waage Sartorius Analytic	wtm Wägetechnik, München

Zentrifugen: Centrifuge 5417C Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B mit SS34/GSA-Rotor Kühlzentrifuge Rotixa/KS Kühlzentrifuge MIKRO 22 R	Eppendorf, Hamburg DuPont Instruments, Bad Homburg Hettich, Tuttlingen Hettich, Tuttlingen
--	---

Tab. 5 In dieser Arbeit verwendete Geräte

2.1.10. Software zur Auswertung der enzymkinetischen Messungen

Bezeichnung	Anwendungsgebiet	
Flucol 14	Steuerung von SM25	Labor Prof. Machleidt LMU München
Flukin 49	Auswertung der SM25 Messungen	Labor Prof. Machleidt, LMU München
FigureP	Enzymkinetische Auswertung der Messergebnisse	Biosoft, Cambridge, GB

2.1.11. Substrate der HIV-1 Protease

Bezeichnung	AS-Sequenz	Bezugsquelle
HIV Proteasesubstrat III	H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu- [*] -p-nitro-Phe Glu-Ala-Nle-Ser-NH ₂	BACHEM, Heidelberg
HIV Fluoreszenzsubstat	DABCYL- γ - Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr- [*] -Pro-Ile- Val-Gln-EDANS [*] Spaltstelle der HIV-Protease	BACHEM, Heidelberg

2.1.12. Inhibitoren der HIV-Protease

Wirkstoff	Abk	Handelsname	Bezugsquelle
Amprenavir	APV	Agenerase	Glaxo Wellcome, Greenford, GB
Indinavir	IDV	Crixivan	Merck Research Laboratories, Rahway NJ, USA
Nelfinavir	NFV	Viracept	Agouron Pharmaceuticals Inc., La Jolla, CA, USA
Ritonavir	RTV	Norvir	Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA
Saquinavir	SQV	Invirase/Fortovase	Roche Products LTD., Welwyn Garden City GB
Lopinavir / Ritonavir	LPV	Kaletra	Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA

2.1.13. Plasmide

Name	Relevanter Selektionsmarker	Bezugsquelle / Referenz
pBD2	AmpR	Bröker, 1986
pBD2-WT	AmpR	Seelmeir, unveröffentlicht
pBD2-Ro	AmpR	Seelmeir, unveröffentlicht
p64	AmpR	Seelmeir, unveröffentlicht

puc18	AmpR	Stratagene, Heidelberg
-------	------	------------------------

2.1.14. Größenstandards DNA / Proteingel

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

2.1.15. Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Bezugsquelle / Referenz
P3	CGC GGA TCC GGC CTT CCT ACA AGG GAA G	Roth, Karlsruhe
P4	GCC AAG CTT TCA AAA ATT TAA AGTGCA ACC	Roth, Karlsruhe
P3D2	CGG GGA TCC TTC AGA GCA GAC CAG AG	Roth, Karlsruhe
P4M	GCC AAG CTT TCA AAA ATT TAA AGT GCA ACC AAT	Roth, Karlsruhe
Geno1N	GGC TGT TGG AAA TGT GGR AAR GA	Applied Biosystems, Weiterstadt
Geno2N	TTA CAT CAT TAG TGT GGG CA(G/C)	Applied Biosystems, Weiterstadt;

2.1.16. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurde EDTA-Blut bzw. Plasma von HIV-infizierten Patienten aus verschiedenen Kliniken Münchens (Medizinische Klinik Innenstadt, Frauenklinik der Universität München, Medizinische Poliklinik / HIV-Ambulanz, Dermatologische Klinik der Universität München, Klinikum Großhadern und Städtisches Krankenhaus München-Schwabing) und eine Blutprobe aus der Universitätsklinik Regensburg, die in den meisten Fällen zur genotypischen Resistenztestung an das Max-von-Pettenkofer Institut gesandt wurden, herangezogen.

Die Viruslast der Patienten lag zwischen 1900 Kopien / ml und 230.000 HIV-RNA-Kopien / ml.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

2.2.2. E. coli – Kultur

E. coli-Kulturen wurden eingesetzt zur Überprüfung des Transformationserfolges über eine DNA-Minipräparation (2.2.4.3.1), zur rekombinanten Expression der HIV-Protease mit anschließender Midipräparation (2.2.4.3.2) und zur Herstellung elektrokompetenter Zellen (2.2.14.2).

E. coli-Stämme wurden entweder als LB-Flüssigkulturen im Schüttler (220 rpm) oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank unter aeroben Bedingungen angezchtet. Für die DNA-Minipräparation wurden entweder 5 ml E. coli Kultur in LB-Medium in Reagenzgläsern geschüttelt oder der Übernachtskultur einer Elektrotransformation entnommen. E. coli-Kulturen für die Midipräparation und die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden in Erlenmeyerkolben in entsprechenden Mengen LB-Medium hochgezogen.

2.2.3. Glycerinkultur

Zur Konservierung elektrokompetenter Zellen und bereits in E. coli transformierter, rekombinanter Plasmide zur späteren Expression der HIV-Protease wurden 400 µl einer E. coli-Kultur mit dem gleichen Volumen Glycerin (konzentriert) in einem Gefäß „safe lock“ (Eppendorf AG, Hamburg) gevortext und bei -70 °C aufbewahrt.

2.2.4. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.4.1. Isolierung von genomischer DNA aus PBMCs von Patienten

Zur Isolierung von DNA aus PBMCs wurden zuerst die Erythrozyten durch Zugabe von 8 ml Hämolysepuffer (aus CINA Kit, s.o.) zu 2 ml EDTA-Blut und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei ca. 800 UPM wurde der Überstand abgenommen und mit weiteren 8 ml Hämolysepuffer resuspendiert. Nach Zentrifugation unter identischen Bedingungen wurde das Zellpellet in 1 ml PBS-FKS-Gemisch aufgenommen und mit Hilfe des Sysmex-Zellzähl-Geräts auf eine Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ / ml eingestellt. Zur Extraktion der proviralen HIV-DNA wurde die Zellsuspension aufkonzentriert, indem sie 1 min bei 1000 UPM zentrifugiert und 800 µl des Überstandes verworfen wurde. Die Restmenge von 200 µl wurde in den

„High Pure Viral Nucleic Acid“-Isolationskit eingesetzt und nach Herstellerangabe zur Gewinnung der DNA verarbeitet. Die isolierte DNA wurde als Template für die PCR verwendet oder bis zur Amplifikation bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2. Isolierung von viraler RNA aus Patientenplasma

Nach Abtrennung der zellulären Bestandteile von EDTA-Vollblut wurde in Modifikation der Volumenangaben der Protokollvorschrift des „*High Pure Viral Nucleic Acid-Kits*“ 400 µl Plasma mit 100 µl Proteinase K versetzt und nach Inkubation und Anzentrifugation 200 µl Isopropanol zugegeben. Nach Zusatz von 500 µl Inhibitor Removal Puffer wurde die Isolierung gemäß der Anleitung des Herstellers fortgesetzt. Die Elution der Nukleinsäure erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer in ein sauberes Nuklease-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die isolierte RNA wurde anschließend 10 min bei 65 °C linearisiert und danach entweder sofort für die c-DNA-Synthese verwendet oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Prinzip des “High Pure Viral Nucleic Acid”- Aufreinigungssystems:

Die DNA/RNA wird durch Lyse mittels Proteinase K freigesetzt. Die Nukleinsäure wird danach an eine Glasfasermatrix gebunden. Die anschließenden Waschschriffe dienen der Entfernung aller anderen störenden Materialien. Durch Elution mit Nuklease-freiem Aqua dest. erhält man schließlich gereinigte DNA / RNA.

2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

2.2.4.3.1. *Minipräparation*

Eine Minipräparation zur Extraktion rekombinanter DNA aus E. coli und Kontrolle des Transformationserfolges wurde routinemäßig nach der Elektrotransformation durchgeführt. Es kamen zwei Methoden zur Anwendung:

a) DNA-Präparation mit Hilfe des Nucleobond AX20-Isolationskits

Es wurden 5 ml einer LB-Kultur gemäß Testprotokoll eingesetzt und nach Hersteller-vorgabe zur Gewinnung von Plasmid-DNA verarbeitet.

Prinzip: Bei diesem Testkit handelt es sich um einen aus Silicagel bestehenden Anionenaustauscher, der die anionischen Nukleinsäuren sehr spezifisch bindet. Anschließend wird die DNA mit Salzlösungen (KCl) aufsteigender Konzentration eluiert.

b) Ein modifiziertes Protokoll der „boiling method“ (nach Del Sal; 1988, modifiziert von J. Blusch)

Diese Methode wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte fanden in der Tischzentrifuge „Centrifuge 5417C“ der Firma Eppendorf bei 14000 UPM statt. Nach Abzentrifugieren des Überstandes (1 min) wurde dem Bakterienpellet 4 µl Lysozym (5 mg / ml) und 200 µl STET-Lösung (8 % Saccharose; 0,1 % TritonX-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) zugesetzt. Nach intensivem Vortexen wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur und anschließend weitere 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 - 10 min) wurde das pelletierte Zell-Lysat mit einer sauberen Pipettenspitze entfernt. Zum Überstand wurden 8 µl CTAB-Lösung (5 %) zugefügt. Nach Zentrifugation (5 min) wurde der Überstand verworfen und der Komplex mit 500 µl Aqua dest. gewaschen. Zum Pellet wurden 300 µl 1,2 M NaCl gegeben und der Ansatz für weitere 5 min zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit 750 µl Ethanol präzipitiert, 10 min zentrifugiert und anschließend mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde getrocknet und in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. Für die Restriktion wurden hiervon 5 µl eingesetzt. Damit wurde überprüft, ob das rekombinante Plasmid tatsächlich transformiert wurde. Bei einer erfolgreichen Transformation war nach Restriktion und Auftrennung im Agarosegel eine dem HIV-Protease-Gen entsprechenden Bande bei 500 bp sichtbar.

Prinzip: Mit Hilfe von Lysozym, einem Detergenz (Triton), osmotischem Stress (Saccharose) und Hitze wird die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen freigesetzt. Während der Aufreinigung wird die DNA an CTAB gebunden und mit NaCl wieder eluiert.

2.2.4.3.2. Midipräparation

Die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA für die Vektorherstellung erfolgte mit Hilfe des Nucleobond PC100 Kit aus 50-100 ml LB-Kultur nach Herstellerangabe.

2.2.5. Molekulargenetische Ansätze

2.2.5.1. Reverse Transkription

Für die nachfolgende PCR muss die RNA zunächst in c-DNA umgeschrieben werden. Dies sollte möglichst bald nach der Extraktion geschehen, da DNA wesentlich stabiler als RNA ist. In ein RNase freies Eppendorfgefäß (Eppendorf Biopur[®], Ep-

pendorf AG, Hamburg) wurden zur Durchführung der reversen Transkription pipetiert:

5 x Puffer	4	µl
DTT (0,1 M)	2	µl
dNTP (5 mM)	2	µl
3'Primer (Geno2)	2	µl
Superscript II-Reverse Transkriptase (200 U / µl)	0,2	µl
RNA-Eluat	10	µl
<hr/>		
Gesamtvolumen ca.	20	µl

Zu beachten ist, dass die isolierte RNA vor dem Mischen mit den Transkriptionsreagenzien 10 min bei 65 °C inkubiert wird. Dann wird die RNA für 1 Stunde bei 45 °C in cDNA umgeschrieben

2.2.5.2. Nested Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ziel der PCR

Die PCR dient der Vervielfältigung eines Genabschnittes (Amplifikation), in diesem Fall der Amplifikation des Genabschnittes der HIV-Protease auf der proviralen DNA bzw. nach der reversen Transkription des entsprechenden Genbereichs auf der synthetisierten c-DNA. Dies ist nötig, da die Menge an isolierter bzw. umgeschriebener c-DNA für die weiterführenden Versuche nicht ausreicht.

1. PCR:

Die erste PCR dient der Vervielfältigung eines Genbereichs, innerhalb dessen die HIV-Protease liegt. Das Amplifikationsprodukt wird dann in die 2. PCR (entspricht der nested PCR) eingesetzt, in der ein weiter eingegrenzter, die HIV-Protease eng umfassender Genabschnitt vervielfältigt und damit die Amplifikationseffizienz erhöht wird. Die 1. PCR wurde mit Reagenzien des "Expand Long Template PCR Systems" (Roche, Mannheim) durchgeführt. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	10	µl
(cDNA nach RT bzw. DNA-Eluat)		
dNTP (je 1,25 mM)	14	µl
10x Puffer	5	µl
Primer 1 (Geno1N, 10 µM)	2	µl

Primer 2 (Geno2N, 10 µM)	2	µl
Taq Polymerase (5 U / µl)	0,75	µl
Aqua dest.	16,25	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Die 1. PCR-Reaktion wurde im Thermocycler 9600 der Firma Perkin Elmer mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt			Vorgang
1.	2 min	92 °C	Denaturierung der DNA
2.	10 sec	92 °C	Denaturierung der DNA
3.	30 sec	50 °C	Anlagerung der Primer (Annealing)
4.	2 min	68 °C	Polymerisation durch Taq-Polymerase
Die Schleife (Schritt 2. - 4.) wurde 10 x wiederholt; Temperaturanstieg 4 °C / s			
5.	10 sec	92 °C	siehe 2.
6.	30 sec	50 °C	siehe 3.
7.	2 min	68 °C	siehe 4.
Die Schleife (Schritt 5. - 7.) wurde 25 x wiederholt; Temperaturanstieg 2 °C / s (5.) bzw. 1 °C / s (6. u. 7.)			
8.	7 min	68 °C	Vervollständigung der DNA-Strangsynthese
9.	∞	4 °C	Kühlen des Ansatzes

2. PCR:

Um die Ausbeute an PCR-Produkt zu maximieren, wurde eine weitere PCR abgeschlossen. Die Primer der 2. PCR begrenzen einen Genabschnitt von 500-600 bp Länge. Anfangs wurde Version A für die Amplifikation gewählt. Aus Gründen, die im Ergebnisteil erläutert werden, kam im Laufe der vorliegenden Arbeit Version B zur Anwendung.

Version A:

Amplifikat 1. PCR	1	µl
dNTP (je 10 mM)	1,25	µl
10 x Puffer (ohne MgCl ₂)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	6	µl
Primer 1 (P3 ; 10 µM)	2	µl
Primer 2 (P4 ; 10 µM)	2	µl
AmpliTaq Gold Polymerase (5 U / µl).	0,3	µl
Aqua dest.	32,45	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Version B:

Amplifikat 1. PCR	1	µl
dNTP (je 1,25 mM)	8	µl
10 x Puffer (ohne MgCl ₂)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	6	µl
Primer 1 (P3D2 ; 10 µM)	5	µl
Primer 2 (P4M ; 10 µM)	5	µl
AmpliTaq Gold Polymerase (5 U / µl).	0,3	µl
Aqua dest.	19,7	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Für die 2. PCR A und B wurde ein Cycler von Biometra mit folgendem Programm benutzt:

Schritt			Vorgang
1.	12 min	95 °C	Denaturierung der DNA und Aktivierung der AmpliTaqGold-Polymerase
2.	30 sec	94 °C	
3.	45 sec	48 °C	Schritt 2. bis 5. siehe 1. PCR
4.	60 sec	72 °C	
Diese Schleife (Schritt 2. - 4.) wurde 40 x wiederholt			
5.	15 min	72 °C	
6.	∞	4 °C	Kühlen des Ansatzes

2.2.5.3. Ausschluss der Kontamination von DNA in der RNA-Extraktion

Um phänotypische Resistenzergebnisse aus DNA bzw. RNA-Material gegenüberstellen zu können, muss eine separate Aufarbeitung ausgehend von der jeweiligen Nukleinsäure gewährleistet sein. Bei der DNA-Analyse stellt die RNA-Kontamination kein

Problem dar, da hier der Schritt der reversen Transkription fehlt und die RNA-Matrize mit der verwendeten Polymerase nicht vervielfältigt wird. Bei der RNA-Analyse hingegen muss die Präsenz von DNA-Kontamination ausgeschlossen werden, da die DNA bei der nachfolgenden PCR mitamplifiziert wird und so das Ergebnis verfälschen könnte. Deshalb wurde als Kontrolle das RNA-Eluat ohne vorherige reverse Transkription (siehe 2.1.4.1) direkt in die nested PCR eingesetzt. Nach der 2. PCR wurden 5 µl PCR-Produkt auf ein Agarosegel (2.2.6.) aufgetragen. Eine fehlende oder nur sehr schwache Bande bei ca. 500 bp in Zusammenschau mit dem Ergebnis der PCR-Amplifikation aus RNA nach reverser Transkription wurde als Nachweis dafür angesehen, dass keine bzw. keine für die nachfolgende Amplifikation relevante Menge an entsprechender DNA-Matrize im RNA-Eluat vorhanden war. Eine deutliche Bande entsprechender Größe sprach hingegen für DNA-Verunreinigung. Diese „kontaminierten“ Proben wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

2.2.5.4. PCR mit Plasmid als Matrize für Sequenzierung

Zur Überprüfung der HIV-Proteaseregion auch nach Restriktion, Ligation und Elektrottransformation, wurden stichprobenartig Minipräparationen (2.2.4.3.1.) nach Elektroporation (2.2.14.) und Übernachtskultur einer Sequenzanalyse unterzogen.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Minipräparation	1	µl
dNTP (je 1,25 mM)	10	µl
10 x Puffer (ohne MgCl ₂)	5	µl
MgCl ₂	6	µl
P3 bzw. P3D2	3-5	µl
P4 bzw. P4M	3-5	µl
AmpliTaQ Gold Polymerase (5U / µl)	0,3	µl
Aqua dest.	ad. 50	µl

Die Amplifikationsbedingungen waren identisch mit den unter 2.2.5.2. für die 2. PCR beschriebenen Angaben.

2.2.5.5. Sequenzierung der amplifizierten HIV-1-Protease-Fragmente

Für die Sequenzierung wurde das in 2.1.3 gewonnene Eluat des PCR-Produktes oder eine Plasmidpräparation aus einer E.coli-Kultur verwendet. Die Sequenzierung wurde nicht routinemäßig durchgeführt, sondern nur im Falle von deutlichen Diskre-

panzen zwischen DNA und RNA und als stichprobenartige Kontrolle um festzustellen, ob die Sequenz der HIV-Protease kodierenden Region während des komplexen Präparationsablaufs, insbesondere während der rekombinanten Expression im E.coli System unverändert blieb. Die Sequenzierungsergebnisse der RNA wurden freundlicherweise von der diagnostischen Abteilung des Max-von-Pettenkofer Institutes zur Verfügung gestellt.

2.2.5.5.1. Sequenzierungsreaktion

Mit den Amplifikaten der HIV-Protease-Region wurde jeweils mit den bereits in der PCR verwendeten Forward- bzw. Reverse-Primern eine Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Die durchgeführte Sequenzierungsmethode basiert auf dem Prinzip des „Dye-Dideoxy-Sequencing“ (Sanger et al.; 1977).

Der Sequenz-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

T-Mix, Big Dye	4 µl
aufgereinigtes PCR-Fragment	1-2 µl
in der 2. PCR verwendeter Primer:	0,5 µl (5´ und 3´ getrennt)
P3 bzw. P3D2 oder P4 bzw. P4M	
<hr/>	
Aqua dest.	ad. 20 µl

Der Ablauf der Sequenzreaktion fand im „Uno II Silver Thermocycler“ (Biometra, Göttingen) mit dem folgendem Programm statt:

Schritt			Vorgang
1.	2 min	96°C	Denaturierung der DNA
2.	15 sec	94°C	Denaturierung der DNA
3.	15 sec	50°C	Annealing der Primer
4.	4 min	60°C	DNA-Strangverlängerung durch AmpliTaq FS-Polymerase
Diese Schleife (Schritt 2. - 4.) wurde 15 x wiederholt; der Temperaturanstieg („ramp“) wurde auf 1 °C / s eingestellt			
5.	∞	4°C	Kühlen des Ansatzes

2.2.5.5.2. Aufreinigung des Sequenzansatzes

20 µl der Sequenzprobe wurden mit 50 µl Ethanol absolut und 2 µl Na-Acetat (pH 5,2) für 10 min. auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 14000 UPM für 30 min. wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 250 µl 70

%-igem Ethanol gewaschen. Nach abermaliger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 UPM für 10 min. und Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur Gelelektrophorese wurde die Probe bei 8 – 12 °C im Kühlschrank aufbewahrt

2.2.5.5.3. Sequenzanalyse

Die Gelelektrophorese zur Bestimmung der Sequenz der HIV-Protease-Region wurde im Einspurverfahren auf dem „ABI PRISM DNA Sequencer377A“ (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte mit Hilfe des „ABI Sequence Navigator“-Programmes (Perkin Elmer, Weiterstadt).

2.2.6. Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Größe im Agarosegel durch das Anlegen elektrischer Spannung aufgetrennt werden. Kleinere Moleküle gelangen dabei leichter durch die Matrix des polymerisierten Geles und laufen deshalb schneller und weiter als größere Nukleinsäuremoleküle.

Zur Herstellung eines Geles wurde die Agarose (Endkonzentration 1,4 %) mit 1x TEA-Puffer gemischt und durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurde dem Gel 0,5 µg / ml Ethidiumbromid zugefügt und diese Mischung in den mit Spacern abgedichteten und mit einem Kamm versehenen Elektrophoreseschlitten gegossen. Für das analytische Agarosegel wurden 50 ml, für präparative Gele 200 ml verwendet. Nach dem Erkalten wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Gelkammer gesetzt und 1 x TAE Puffer bis zur vollständigen Bedeckung zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6 x „loading dye“ versetzt und in die Gelaschen pipettiert. Für ein 50 ml-Gel wurden 5 µl, für ein 200 ml-Gel 45 µl DNA Probe pro Tasche eingesetzt. In eine weitere Geltasche wurde 1 bzw. 2 µl des Längenmarkers „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, der nach Herstelleranweisung mit Aqua dest. und 1x loading dye versetzt wurde, eingebracht. Die Konzentration der DNA in dieser Lösung beträgt 83 µg / ml. Das 500 bp lange Fragment macht 7 % dieser Menge aus. Durch den Vergleich mit dem Längenmarker kann das ca. 500 bp lange HIV-Protease-Gen identifiziert werden, außerdem kann dessen ungefähre Menge durch die Dicke der Bande abgeschätzt werden, was für den Einsatz des HIV-Protease-Gens in der Ligation von Bedeutung ist..

Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung von 70 V bei Verwendung einer kleinen Gelkammer oder bei Verwendung einer großen Kammer bei einer Spannung von 110 V.

Mit Hilfe des Ethidiumbromids können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese Substanz interkaliert in die Doppelhelixstruktur der DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht.

2.2.7. Analyse des PCR-Produktes aus DNA / cDNA

Auf das Agarosegel (50 ml) wurden in jede Spur 5 µl PCR-Produkt (siehe 2.2.5.2.) aufgetragen und aufgetrennt. Das Ergebnis wurde photographisch dokumentiert, mit dem Längenmarker verglichen und nur die Proben mit einer entsprechenden Bande von 500 bis 600 bp für das präparative Gel eingesetzt.

2.2.8. Präparatives Gel und Elution des Proteasefragmentes aus dem Agarosegel

Die restlichen 45 µl des PCR-Produktes wurden auf ein präparatives Agarosegel (200 ml) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die korrekte „Proteasebande“ bei 500 - 600 bp wurde so exakt wie möglich mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Die DNA wurde anschließend mit dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aus dem Gel nach Herstellerangabe extrahiert und gereinigt. Unter den Elutionsoptionen wurde jene gewählt, bei der zunächst 25 µl Aqua dest. verwendet werden, gefolgt von einer zweiten Elution mit 20 µl Aqua dest. Für das weitere Vorgehen standen also ca. 45 µl des gereinigten PCR-Fragmentes, das die HIV-Protease kodiert, zur Verfügung.

Prinzip: Das verwendete Testsystem macht sich die quantitative Bindung von Nukleinsäure an Silikat-Gel-Partikel in Anwesenheit von hochkonzentrierten Salzlösungen zunutze. Nach diversen Waschschritten führt Aqua dest. zur Ablösung der Nukleinsäure vom Adsorptionsmaterial (Niedrigsalzbedingungen).

2.2.9. Restriktion

Die Primer der 2. PCR besitzen an ihren Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (P3, P3D2) und HindIII (P4, P4M). Nach dem Schneiden dieser Enden ist es möglich, das DNA-Eluat mit der genetischen Information der HIV-Protease in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor einzuklonieren.

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Eluat	35	µl
10fach-konzentrierter	5	µl
Restriktionspuffer		
BamHI (40 U/µl)	0,5	µl
HindIII (40 U/µl)	0,5	µl
Aqua dest.	9	µl

Das Protease-Fragment wurde 2 Stunden bei 37 ° C restringiert.

Nach dem Schneiden wurde der Ansatz entweder aufgereinigt oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.10. Aufreinigung des Restriktionsansatzes

Mit Hilfe des oben beschriebenen QIAEXII Kits wurden Salze der Pufferlösung und die Restriktionsenzyme entfernt, die die nachfolgende Ligation (2.2.13.) stören könnten. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurde die DNA mit 25 µl Aqua dest. eluiert.

2.2.11. Bestimmung der Konzentration des geschnittenen Proteasefragmentes

Es wurden 5 µl DNA-Eluat aus der Aufreinigung des Restriktionsansatzes auf ein Agarosegel (50 ml) aufgetragen. Da die Menge des mitgelaufenen Längenmarkers und der prozentuale Anteil der 500 bp Bande bekannt waren (siehe 2.2.6.), konnte die ungefähre Menge des PCR-Produktes abgeschätzt werden. Für die Abschätzung ist es wichtig, dass die Vergleichsbande eine ähnliche Größe aufweist, da die Menge an eingelagertem Ethidiumbromid auch von der Größe der DNA Moleküle abhängt und die Signalstärke entsprechend variiert.

2.2.12. Vektorherstellung

2.2.12.1. Allgemeines

Die Herstellung der HIV-Protease basiert auf deren rekombinanten Expression in *E. coli*. Dafür muss das Genfragment, das die Protease kodiert, erst in einen Vektor inkloniert werden. Dieses Konstrukt wird dann in Bakterien transformiert.

Für die Vektorherstellung wurde der puc-Abkömmling pBD2 verwendet, der eine verkürzte Form des lacZ-Genes von *E. coli* enthält. Dieses Gen wird sowohl am 5' als auch am 3' Ende von einer Polylinkerregion flankiert (Bröker et al., 1986). Gene, die

an diese Form des lacZ-Genes gekoppelt sind, haben den Vorteil, dass durch die Verbindung mit einem bakteriellen Protein eine intrazelluläre Degradierung des Genproduktes eingeschränkt wird. Durch die Restriktion mit den Enzymen BamHI und HindIII in der Polylinkerregion erhält man überhängende Enden, die mit den unter den gleichen Bedingungen geschnittenen Enden des PCR-Produktes (Protease-Fragment) durch Ligase kovalent verknüpft werden können.

2.2.12.2. Midipräparation des Plasmids pBD2

Zunächst wurde eine ausreichende Menge des Plasmids pBD2 hergestellt und geschnitten, damit für die durchzuführenden Ligationen mit dem Protease-Genfragment aus Patientenmaterial genügend Vektor der gleichen Charge zur Verfügung stand. Dafür wurde eine bereits vorhandene pBD2-Lösung (190 µg / ml) 1:1000 verdünnt. Für den Transformationsansatz wurden 2 µl dieser Verdünnung mit 10 µl elektrokompetenten Zellen und 30 µl Aqua dest. gemischt und für die Elektroporation verwendet (Bedingungen siehe 2.2.14.3.). Die der Elektroporation unterzogene Zellsuspension wurde nach Zugabe von 960 µl SOC-Lösung und einstündiger Inkubation im Schüttler bei 37 °C auf LB / Ampicillin-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Abend des nächsten Tages wurde von den gewachsenen Kolonien eine ausgewählt und in 50 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz überimpft. Diese Kultur wurde über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidpräparation mit dem Kit „Nucleobond AX100“ der Firma Macherey & Nagel. Dabei wurde nach Herstelleranweisung vorgegangen.

2.2.12.3. Konzentrationsbestimmung des Plasmids

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Plasmid-DNA erfolgte durch photometrische Messung (Photometer: Ultrospec Plus) in Quarzküvetten bei 260 und 280 nm. Der Absorptionswert = 1 bei einer OD von 260 nm entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml (bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm). Zusätzlich wurde der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} ermittelt, der ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure darstellt. Bei Werten zwischen 1,6 und 2,0 liegt die Nukleinsäure in relativ sauberer Form vor. Bei Verunreinigungen mit Proteinen ist der Quotient meist $< 1,6$, bei Verunreinigungen mit RNA ist er in der Regel > 2 (Sambrook et al., 1989).

Die hergestellte Plasmidpräparation wies eine Konzentration von 170 µg/ml auf (bei einer Ratio OD_{260nm} / OD_{280nm} von 1,53).

2.2.12.4. Restriktion und Aufreinigung des Plasmids

In 3 Ansätzen wurden jeweils 20 µl Plasmid (entspricht 3,4 µg DNA) mit 40 U BamHI und Restriktionspuffer gemischt und mit Aqua dest. auf 30 µl aufgefüllt. In weiteren 3 Ansätzen wurde anstatt BamHI 40 U HindIII zugefügt. Danach erfolgte eine einstündige Restriktion bei 37 °C. 2 µl aus jedem Ansatz wurden auf ein Agarosegel (50 ml) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob die Plasmide vollständig geschnitten worden waren. Bei vollständiger Restriktion eines einfach geschnittenen Plasmids sieht man eine Bande, beim Vorhandensein ungeschnittener Plasmidanteile wären unter Umständen noch weitere Banden sichtbar (z.B. supercoiled DNA). Die restlichen 28 µl der 6 ersten Restriktionsansätze wurden mit 40 U des jeweils anderen Enzyms (wenn zuerst BamHI verwendet wurde, wurde HindIII zugefügt und umgekehrt) unter den oben genannten Bedingungen geschnitten. Hierbei betrug das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes 50 µl.

Anschließend wurde die geschnittene Plasmid-DNA auf einem präparativen Gel analysiert. Nach exaktem Ausschneiden der entsprechenden Bande bei ca. 500 bp wurde die DNA mit dem QIAEXII Kit aus dem Gel extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit Ausnahme der Elutionsvolumina, die im ersten Durchgang 30 µl und bei der zweiten Elution 20 µl betragen. Die auf dem Gel abgeschätzte Menge an Vektor-DNA betrug 80 µg / ml.

Da die Rate der Selbstligation bzw. des nicht geschnittenen Vektors mit 2000 Kolonien nach Elektroporation (siehe 2.2.13. und 2.2.14) zu hoch war, wurde die oben beschriebene Prozedur wiederholt. Hierzu wurden für die Restriktionen jeweils 80 U Enzym verwendet. Die anschließend durchgeführte Ligation ohne Zugabe von Fragment ergab 190 Kolonien / Platte. Dieses Ergebnis wurde unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen als akzeptabler Background angesehen.

2.2.13. Ligation

In diesen Reaktionsschritt wurde das bereits geschnittene PCR-Produkt (siehe 2.2.8. - 2.2.11.) in den hergestellten Vektor mit Hilfe des Enzyms Ligase inkloniert.

Für diesen Ansatz wurde verwendet:

Restringierter Vektor	ca. 50 ng
Restringiertes Fragment	ca. 5-fache der molaren Menge des Vektors
T4 DNA-Ligase (1U/µl)	1 µl

10x Ligationspuffer	1 bzw. 2 µl
Aqua dest.	ad 10 bzw. 20 µl

Bei jedem Ansatz wurde eine Vektorkontrolle mitgeführt, um das Ausmaß der Selbstligation oder nicht geschnittenen Vektors einzuschätzen. Hierbei wurde die Ligation ohne Zugabe von Insert durchgeführt. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank bei ca. 9 °C inkubiert.

2.2.14. Elektrotransformation

2.2.14.1. Vorbereitung des Ligationsansatzes für die Elektroporation

Da bei der Durchführung der Elektroporation keine Salze vorhanden sein dürfen, musste der Ligationsansatz vorher aufgereinigt werden. Dafür wurde das Volumen zuerst mit Aqua dest. auf 100 µl erhöht. Durch Zugabe von 1 µl RNA-Lösung (2 mg/ml), 10 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 3 Volumeneinheiten (330 µl) Ethanol absolut wird das DNA-Konstrukt 30 min. bei -20°C gefällt und anschließend 25 min. bei 14000 UPM und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 300 bzw. 200 µl 70 % Ethanol wurde das Pellet in 15 µl Aqua dest. aufgenommen. Das Eluat kann bis zum Einsatz in die Elektroporation bei - 20°C aufbewahrt werden.

2.2.14.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

(Modifiziertes Protokoll nach Dower et al., 1988)

Aus einem Originalstock der in Glycerin bei -70 °C aufbewahrten elektrokompetenten E.coli Zellen wurde jeweils mit einer Impföse in 2 x 5ml LB-Bouillon eingimpft. Die Bakterienkultur wird über Nacht bei 220 UPM und 37 °C geschüttelt und am nächsten Morgen in einen Kolben mit 500 ml LB überführt. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{590nm} zwischen 0,5 und 1 (entspricht der exponentiellen Wachstumsphase / mid-log growth phase; siehe auch Gehringer, 2001) vermehrt. Da die Elektroporation bei hoher elektrischer Spannung durchgeführt wird, benötigt man Zellsuspensionen mit sehr niedriger Leitfähigkeit. Deshalb wurden die Bakterien durch die im Folgenden beschriebenen Waschschrte von störenden Ionen befreit. Alle Arbeitsschritte wurden bei durchgehender Kühlung auf Eis mit gekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte jeweils 15 min. bei 4000 UPM und 4°C. Zu-

erst wurde die Kultur in 250 ml-Zentrifugenbecher gefüllt und mit je 250 ml Aqua dest. (Ampuwa) gewaschen. Der zweite bzw. dritte Waschschrift wurde mit 125 ml bzw. 50 ml Aqua dest. (Ampuwa) durchgeführt. Dann wurde das Pellet in je 15 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Zellen wurden in jeweils 500 µl 10 %-igem Glycerin aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfgläser („safe lock“) aliquotiert und mit Hilfe eines Trockeneis/Ethanol-Gemisches schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C. Die hergestellten Glycerinkulturen sind 6 Monate haltbar, sollten allerdings nach dem Auftauen nicht mehr eingefroren und erneut verwendet werden.

2.2.14.3. Elektroporation

(Modifiziertes Protokoll nach Dower et al., 1988)

Prinzip:

Bakterien werden mit DNA gemischt und kurzzeitig einem elektrischen Feld mit hoher Spannung ausgesetzt. Dadurch werden die Bakterien durchlässig für Nukleinsäuren. Die Elektroporation wird bei niedrigen Temperaturen (zwischen 0°C und 4°C) durchgeführt, da empirisch festgestellt wurde, dass die Transformationseffizienz bei Raumtemperatur um das ca. 100-fache sinkt. Mit Hilfe dieser Methode kann die Transformationseffizienz bis zu 10^9 - 10^{10} Kolonien/µg DNA betragen. Dies ist von großer praktischer Bedeutung für die Effizienz der nachfolgenden Expression der HIV-Protease.

Durchführung:

Die konzentrierten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden 40 µl der elektrokompenten Zellen in ein auf Eis gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Zu den Zellen wurden 7 µl des aufgereinigten, ionenarmen Ligationsansatzes pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Am Gene Pulser™ Apparat (BioRad, München) wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Kondensatorkapazität	25	µFarad
Spannung	2,5	kVolt (für Küvetten mit 0,2 cm Abstand / „gap“ zwischen den Kontaktflächen der Elektroden)
Widerstand der Kontrolleinheit des elektrischen Pulses	200	Ohm

Die Zell-DNA-Mischung wurde in gekühlte Elektroporationsküvetten (mit 0,2 cm „gap“) überführt und einem elektrischen Puls ausgesetzt. Bei den oben genannten Einstellungen betrug die Pulsdauer ca. 4,8 msec. Danach wurden die Zellen sofort von den Elektroden entfernt und mit 960 µl SOC-Medium (Raumtemperatur bzw. 37°C) versetzt. Der Ansatz wurde in sterile Reagenzgläser überführt und eine Stunde bei 37 °C und 200 UPM geschüttelt.

Dieser Schritt führt zur Ausbildung der Ampicillinresistenz von E. coli (bei erfolgreicher Transformation des Resistenzplasmides).

Nach der Inkubation wurden 100 µl des Ansatzes auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der restliche Ansatz wurde mit 9 ml LB-Ampicillin-Bouillon versetzt, auf zwei sterile Reagenzgläser verteilt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt.

Kontrolle der Transformationseffizienz:

10 pg des Plasmids puc18 wurden mit 40 µl elektrokompenten Zellen unter den oben genannten Bedingungen transformiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden 10 µl hiervon auf eine Agarplatte verteilt. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt und die Transformationseffizienz für 1 µg Plasmid-DNA berechnet. In den durchgeführten Transformationsexperimenten lag die Effizienz zwischen $1,9 \times 10^8$ bis $8,3 \times 10^9$ Kolonien pro 1 µg des Plasmides puc18.

2.2.15. Kultur der transformierten Zellen

Dieser Schritt dient der rekombinaten Expression der patientenspezifischen HIV-Protease.

Durchführung:

Von 10 ml der über Nacht inkubierten E.coli-Kultur nach Transformation wurden vorab 1 ml für eine Minipräparation und 0,5 ml für eine Glycerinkultur verwendet. Die restlichen 8,5 ml wurden in 500 ml LB-Ampicillin in einen 2 l Kolben überimpft und im

Schüttler Innova 4000 (New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 220 rpm und 37 °C inkubiert, bis eine OD_{590nm} zwischen 0,4 und 0,5 erreicht wurde. Der Ansatz wurde 2,5 h unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Dann wurde die Bakterienkultur auf 2 Zentrifugenbecher mit 250 ml Fassungsvermögen aufgeteilt und 5 min. bei 4 °C und 5000 UPM abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde bei -20 °C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

Prinzip:

Die Transkription des Lac-Operons auf dem PBD2-Insert-Konstrukt wird durch die Zugabe einer Laktoselösung (0,2 % in LB) induziert. Dadurch wird das nachgeschaltete, inserierte Proteasegen des Patienten im bakteriellen System abgelesen und translatiert. Aufgrund von Vorversuchen (Lindhofer et al., 1995) ist bekannt, dass sich die Protease aus dem Vorläuferprotein nur am aminoterminalen Ende herauspalten kann, am carboxyterminalen Ende ist hingegen der Einbau eines Stoppcodons nötig, das durch die Wahl einer entsprechenden Primersequenz in die Aminosäuresequenz eingebracht wurde. Die HIV-Protease wird nach der intrazellulären Expression nicht sezerniert. Aufgrund der hohen lokalen Konzentration akkumuliert das Enzym dabei zu sogenannten inclusion bodies. Diese zeichnen sich durch eine hohe Dichte aus, weshalb sie durch Zentrifugation angereichert werden können. Aufgrund ihrer Kompaktheit sind sie im Wesentlichen geschützt vor bakteriellen Proteasen und anderen degradierenden Einflüssen.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Gewinnung der Protease aus Bakterienzellen

Durchführung:

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die E. coli –Sedimente mit je 30 ml PBS, versetzt mit einer 0,2 %-igen Tween 20-Lösung, resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden Lysozym (Endkonzentration 200 µg / ml) und 1 U/ml Benzonase hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 min. bei 37 °C wurde die Mischung 10 min. bei 12000 UPM und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem gewonnenen Pellet wurde wiederum die oben beschriebene PBS / Tween-Lösung zugefügt und dieses mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht. Danach erfolgte eine Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Dieser Schritt wurde 3x wiederholt. Das

erhaltene Sediment wurde in 10 ml Lösung 1 durch Ultraschallbehandlung resuspendiert, mit HCl auf einen pH von 2,0 eingestellt und 30 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation wurde der *Überstand* mit einem äquivalenten Volumen Lösung 2 versetzt und weitere 30 min auf Eis gerührt. Um die HIV-Protease im Ansatz anzureichern, wurde eine Fällung mit Ammoniumsulfat (50 % Sättigung) 2 - 3 h auf Eis oder über Nacht auf Eis im Kühlschrank durchgeführt. Nach zwei Zentrifugationsschritten für 15 und 10 min. bei 12000 UPM und 4 °C zur Entfernung des Überstandes wurde das Sediment der HIV-Protease mit 300 - 500 µl (das Volumen richtete sich nach der Größe des Pellets) Assaypuffer (mit 10 % DMSO) versetzt und durch gleichmäßiges Mischen und Inkubation auf Eis für mindestens 30 min. resuspendiert. In dieser Form kann die HIV-Protease über Jahre bei -20 °C aufbewahrt werden.

Prinzip:

Das Detergenz Tween 20 und das Enzym Lysozym bewirken ein Aufbrechen der Bakterienzellwände und damit eine Freisetzung des Zellinhaltes, unter anderem auch der HIV-Protease. Da Nukleinsäuren die nachfolgende Wasch- und Zentrifugationsprozedur durch ihre Viskosität stören, erfolgt ein Verdauungsschritt mit Benzonase. Die Ultraschallbehandlung führt zu einer Zerstörung der bakteriellen Strukturproteine, die dann mit PBS ausgewaschen werden. Im Gegensatz dazu hält die HIV-Protease dieser Behandlung stand, da sie nach der Translation in Form der in 2.2.15. beschriebenen inclusion bodies vorliegt. Die Behandlung mit HCl führt zur Lösung der HIV-1-Protease aus den inclusion bodies. Zudem werden noch vorhandene Proteinreste von *E. coli* irreversibel denaturiert, während die HIV-Protease diesem Schritt gegenüber weniger empfindlich ist. Durch Neutralisierung mit Lösung 2 wird die HIV-Protease renaturiert und damit funktionsfähig.

2.3.2. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Protease (PR)-Lösung

Die Gesamtproteinkonzentration der PR-Lösungen wurde bestimmt, um vergleichbare Proteinmengen auf das SDS-Gel aufzutragen. Dafür wurde das Verfahren nach Bradford (1976) angewandt, das darauf beruht, dass Comassie Brillant Blau eine Verbindung mit Proteinen eingeht und sich dadurch das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Für die Bestimmung wurde 1 ml einer 1:5 verdünnte Bradfordlösung (Testkit Firma Biorad, München) mit einem geeigneten Volumen einer Proteaselösung versetzt. Der

Ansatz wurde nach dem Mischen für 5 min. inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve aus verschiedenen Konzentrationen einer BSA-Lösung wurde der Proteingehalt der jeweiligen PR-Lösung ermittelt.

2.3.3. SDS-PAGE mit Tricینگel

Das Gel diente dem Nachweis der HIV-Protease mit einer entsprechenden Bande bei 11 kDa. Für die Auftrennung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht wie der HIV-Protease (11 kDa) ist die SDS-Page mit tricinhaltigem Kathodenpuffer besonders geeignet. Sie basiert auf der diskontinuierlichen Methode nach Schägger und Jagow (1987). Das Gel setzt sich aus 3 Phasen mit den folgenden Komponenten zusammen:

	„seperating gel“	„spacer gel“	„stacking gel“
40 % Acrylamid	8,9 ml	5,4 ml	0,9 ml
Gelpuffer	8,9 ml	8,9 ml	2,8 ml
Glycerin	2,8 ml	-	-
Aqua dest.	6,0 ml	12,4 ml	7,5 ml
APS (100 mg / ml)	88,9 µl	88,9 µl	88,9 µl
TEMED	8,9 µl	8,9 µl	8,9 µl

Zwischen zwei, mit Ethanol gereinigten, Glasplatten wurde ein Abstandshalter eingelegt und das Gelsystem mit Klammern fixiert. In den Zwischenraum wurden nacheinander das „seperating gel“ (Höhe 13 cm) und das „spacer gel“ eingegossen (Höhe 4 cm). Die zwei Phasen wurden mit einigen mm Aqua dest. zum Schutz vor Austrocknung und zum Sichtbarmachen der Polymerisierung überschichtet. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das „stacking gel“ zugegossen und mit einem Kamm versehen. Die anschließende Auspolymerisation erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proteaselösungen wurden auf 1 mg / ml eingestellt, 60 µl davon wurden mit 20 µl 4xSEB versetzt und für 5 min. im Wasserbad aufgeköcht. Je 7 µl dieser Mischung wurden in eine Geltasche gefüllt. Als Proteinmarker wurden 10 µl ebenfalls aufgeköchte Protein Ladder-Lösung (Gibco BRL) und 15 µl Prestained Marker mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über Nacht bei 30 mA und 90 - 100 V

nachdem das Gel eine Stunde bei 20 mA eingelaufen war. Als Laufpuffer dienten der Anoden- und der Kathodenpuffer.

2.3.4. Silberfärbung des SDS-Proteingele

Die Silberfärbung dient der Sichtbarmachung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine.

Alle Waschschriffe erfolgten unter Schwenken in Aqua dest. für 10 min.

Nach Entfernen aus den Platten wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel für 20 - 30 min. in der Fixierlösung 1 geschüttelt. Anschließend wurde es zweimal gewaschen und in der Fixierlösung 2 für 15 - 30 min geschwenkt. Dann wurde das Gel wieder zweimal gewaschen. Zur Durchführung der Silberfärbung wurde das Gel für 20 - 40 min. in ammonikalischer Silbernitratlösung unter Schütteln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriffe wurde der Entwickler zugegeben, bis die Bandenfärbung optimal erschien. Anschließend kam das Gel zum Abstoppen der Entwicklung in die Entfärbelösung. Nach mehrmaligem Waschen wurde das gefärbte Gel photographiert oder für 30 min. in Geltrocknungslösung geschwenkt und in Trocknungsrahmen für SDS-Gele über Nacht getrocknet.

2.4. Phänotypische Resistenzbestimmung der HIV-Protease

2.4.1. Ermittlung der phänotypischen Resistenz über Reversed Phase Chromatographie (RFC) mit Hilfe einer Endpunktbestimmung

2.4.1.1. Spaltungsansatz und Inhibitionsreaktion

Das für den Spaltungsansatz verwendete „HIV Proteasesubstrat III“ wurde mit DMSO in eine 4 mM Lösung gebracht und mit 1xAssay-Puffer auf 0,4 mM verdünnt. Dieses Substrat besitzt die leicht veränderte Spaltstelle des natürlichen HIV-Protease-Substrates nach dem Capsid-Protein. Die verdünnte Substratlösung wurde bei -20°C eingefroren und ein Aliquot kurz vor dem Spaltungsansatz auf Eis aufgetaut.

Zur Inhibition wurden die damals in Deutschland verfügbaren PIs eingesetzt (Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir). Die Stocklösungen besaßen eine Konzentration von 10 mM in DMSO. Die verwendeten Verdünnungen wurden ebenfalls mit DMSO hergestellt.

50 µl Substratlösung (0,4 mM) wurde mit 1 - 10 µl Proteaselösung (konzentriert bis 1:5 verdünnt) und 10 µl DMSO in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit Aqua

dest. auf 100 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 15 min. bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Spaltungsreaktion wurde mit 300 µl 0,065 % TFA-Lösung gestoppt und der Ansatz auf Eis abgekühlt. Der pH-Wert nach Abstoppen der Reaktion betrug 4,0. Der Ansatz wurde für 3 min. in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 10000 UPM zentrifugiert, um Verunreinigungen, die die Chromatographie stören könnten, zu entfernen. Der gesamte Ansatz wurde in die ÄKTA-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zur chromatographischen Analyse überführt.

Anhand der vom Gerät ermittelten AUC (area under the curve) der Peaks des ungespaltenen Substrates sowie der beiden Spaltprodukte kann der Anteil an gespaltenen Substrat ermittelt werden (siehe B.5.1.2). Die Proteasemenge, die 50 % des Substrates spaltete, wurde für die Inhibitionsreaktion eingesetzt.

Die Inhibitionsreaktion enthielt folgende Komponenten: Volumen der ermittelten Proteasemenge, 50 µl Substratlösung (0,4 mM), 10 µl Inhibitorverdünnung unterschiedlicher Konzentration (10^{-4} M bis 10^{-7} M und $3,3 \times 10^{-4}$ M bis $3,3 \times 10^{-7}$ M in Zehnerstufen) und Aqua dest. in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Sie wurde unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt.

Anhand der Analyse mittels RPC wurde diejenige Inhibitorkonzentration ermittelt, bei der nur noch 50 % der Ausgangsspaltung vorlag. Diese Konzentration entsprach der IC50 des jeweiligen Inhibitors.

2.4.1.2. RPC-Analyse

Die Auftrennung der Spaltungsansätze erfolgte über die „ÄKTA“-Anlage mit einer Nucleosil 120 - 5 C18-Säule (Macherey und Nagel, Düren) als „reversed phase“ Chromatographie (RPC). Die RPC beruht auf der Trennung von Proteinen und Peptiden unterschiedlicher Hydrophobizitätsstärke aufgrund deren reversiblen Interaktion mit der hydrophoben Oberfläche der Säulenmatrix. Zur Elution wurde das organische Lösungsmittel Acetonitril verwendet, das im RPC-Puffer B1 enthalten ist. Als Laufpuffer diente die Lösung A11. Die Dauer eines Laufes betrug 11 min. Nach 1 min. wurde die zu analysierende Probe automatisch dem System zugeführt, anschließend wurde 3,5 min. lang mit dem Puffer A11 ungebundenes Material ausgewaschen. Mit Acetonitril wurde für 4 min. ein Gradient von 0 bis 80 % aufgebaut, dadurch wurden die gebundenen Peptide von der Säule eluiert. Danach erfolgte die Reäquilibrierung der Säule mit dem Laufpuffer A11.

Die Messung der Menge an Substrat und deren Spaltprodukten erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Die Retentionszeit des Substratpeaks betrug 6,85 min, die beiden Peaks der Spaltprodukte erschienen bei den Retentionszeiten 6,35 und 6,55 min.

Nach Bestimmung der AUC der einzelnen Peaks wurde der Anteil an gespaltenem Substrat mit folgender Formel berechnet:

$$\text{gespaltenes Substrat [\%]} = \frac{\text{AUC1} + \text{AUC2}}{\text{AUC0} + \text{AUC1} + \text{AUC2}}$$

AUC1 = integrierte Fläche des Peaks des Spaltproduktes 1 (Retentionszeit 6,35 min)

AUC2 = integrierte Fläche des Peaks des Spaltproduktes 2 (Retentionszeit 6,55 min)

AUC0 = integrierte Fläche des Peaks des ungespaltenen Substrates (Retentionszeit 6,85 min).

2.4.2. Ermittlung der phänotypischen Resistenz mit Hilfe einer kontinuierlichen, enzymkinetischen Messung unter Verwendung eines Fluoreszenzsubstrates

Pro eingesetzte Inhibitorkonzentration sind mit der in 2.4.1.1. beschriebenen Versuchsdurchführung 30 min zu veranschlagen. Damit ist diese Methode sehr zeitaufwändig und aufgrund der Ein-Punkt-Messung relativ ungenau. Von D. Hoffmann wurde deshalb ein Fluoreszenz-basierter enzymkinetischer Assay entwickelt, der einen höheren Durchsatz an Patientenproben erlaubt und dessen Ergebnisse zudem über die Bestimmung bestimmter enzymkinetischer Parameter (K_i) exakter sind (Hoffmann et al., 2000; Hoffmann et al., 2001; Hoffmann, 2002).

2.4.2.1. Testprinzip

Das verwendete Substrat ist ein Octapeptid, dessen Schnittstelle sich von der p17/24 Schnittstelle im Vorläuferproteins Pr 55 GAG herleitet (Matayoshi et al., 1990).

Am C-terminalen Ende befindet sich EDANS als Fluorophor, N-terminal ist der Quencher) DABCYL angehängt. Durch intramolekulare Elektronenverschiebung wird die zugeführte Anregungsenergie auf den Quencher übertragen und das Fluoreszenzsignal stark reduziert. Spaltet die HIV-Protease das Substrat, kann dieser Energietransfer nicht mehr stattfinden und ein Fluoreszenzsignal wird ausgestrahlt, das gegenüber dem gequenchten Signal 40 x stärker ist (Matayoshi et al., 1990). Dabei ist

die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur gespaltenen Substratmenge (Stoffumsatz).

Der Fluoreszenztest wurde anfangs im Küvettenformat und nach Stabilisierung der Testbedingungen im 96-Well Mikrotiterplattenformat durchgeführt.

2.4.2.2. Handhabung und Lagerung der verwendeten Reagenzien

Substrat:

Das Substrat wurde in DMSO gelöst und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und unter Schutz von Lichteinstrahlung (Hoffmann D., 2002).

Assay-Puffer:

Der Assaypuffer wurde als 2-fach konzentrierte Lösung hergestellt. In dieser Form beträgt die Haltbarkeit bei $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ mehrere Wochen. Für den Versuchsansatz wurde er mit Aqua dest. (Ampuwa) 1 : 2 verdünnt und mit 0,1 % (v/v) Nonidet P40 versehen. NP40 ist ein Detergenz, das zur Stabilisierung der Protease während des Messvorganges beiträgt. Detergenzien bilden aufgrund ihrer Molekülstruktur in wässrigen Lösungen ab einer bestimmten Konzentration (der CMC, siehe unten) sogenannte Micellen, die die Proteasemoleküle einschließen und somit vor äußeren Einflüssen schützen. Die Konzentration von 0,1 % wurde so gewählt, dass sie deutlich über der kritischen Micellen-Konzentration (CMC) lag (Hoffmann D. 2002).

Proteaseinhibitoren:

Die Feststoffe wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Auflösen erfolgte in DMSO zur Herstellung einer 10 mM Stocklösung, diese wurde wiederum 1 : 100 auf $100\text{ }\mu\text{M}$ verdünnt. Davon ausgehend wurden weitere Verdünnungen in Zehnerschritten bis $0,1\text{ }\mu\text{M}$ und zusätzlich die Konzentrationen $0,5\text{ }\mu\text{M}$ und $5\text{ }\mu\text{M}$ hergestellt. Die PI-Lösungen wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Inhibitionsansätze im Küvetten- und Mikrotiterplattenformat wurden in der Regel die Konzentrationen von $0,1\text{ }\mu\text{M}$ bis $5\text{ }\mu\text{M}$ eingesetzt. Die Aliquots wurden bis zu 5 Mal verwendet und zwischen den Messungen bei $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt (Hoffmann D., 2002).

2.4.2.3. Aktivitätsmessung der Protease im Küvettenformat

2.4.2.3.1. Allgemeines

Die Durchführung der Messungen erfolgte am Fluorometer SFM 25 (Biotek-Kontron, Neufahrn). Das Gerät besitzt 4 Messplätze, die über einen Küvettenwechsler bewegt werden. Für jeden Küvettenansatz kann ein Messwert pro Minute aufgenommen werden. Die Temperatur wurde mit dem Thermostaten K20 (Haake, Karlsruhe) auf 30°C konstant gehalten. Es wurden Einmalküvetten aus Polystyrol (Müller-Rationlab, Dreieich-Buchsschlag) verwendet.

Die am Fluorometer eingestellten Wellenlängen betragen für die Exzitation (Anregung) 355 nm und für die Emission (Ausstrahlung) 480 nm. Bei diesen Wellenlängen ist die Gleichheit des Fluoreszenzsignales der EDANS-Eichlösung und der Spaltprodukte gewährleistet (Hoffmann D., 2002). Die Messung und Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale pro Minute wurde mit Hilfe des Programms Flucol 4 gesteuert.

2.4.2.3.2. Versuchsansatz

Nach jedem Einschalten der Fluoreszenzlampe und Eingabe der Exzitations- und Emissionswellenlängen wurde das Fluorometer mit 500 µl 2000 nM EDANS, gelöst in Assay-Puffer, neu geeicht. Das erhaltene Fluoreszenzsignal wurde auf 100% gesetzt. Die Herstellung der Eichlösung erfolgte aus einer 100 µM EDANS-Stocklösung, die mit Assay-Puffer verdünnt wurde. In das Programm Flucol4 wurde anschließend die Konzentration der Eichlösung, die Dauer der Messung, sowie weitere, den Messablauf betreffende Parameter eingegeben. Das Reaktionsvolumen betrug ca. 500 µl.

In vier Küvetten wurden jeweils folgenden Komponenten pipettiert:

Assay-Puffer (mit 0,1% NP 40)	450 µl
DMSO	35 µl
Substrat (12 µM)	15 µl

Die Ansätze wurde mit einem Rührstäbchen gemischt, in die Messplätze des Fluorometers gestellt und die Messung gestartet. Mit 2 - 3 Messdurchgängen vor Proteasezugabe wurde die Stabilität des Fluoreszenzsignales überprüft. Dann wurde in jede Küvette die gleiche Menge an Proteaselösung (mit v0 zwischen 10 und 30 nM

/min) pipettiert und der Stoffumsatz pro Minute über ca. 15 Durchgänge bzw. 15 Minuten lang gemessen. Dann wurden in die Küvetten verschiedene Konzentrationen an Proteaseinhibitorlösung zugegeben. Die Proteaseaktivität nach Inhibition wurde über weitere 15 Messungen verfolgt.

2.4.2.3.3. Auswertung der enzymkinetischen Daten aus Flukol4 mit Flukin49

Flukol4 erfasst die Zunahme des Fluoreszenzsignales pro Zeiteinheit. Damit das Programm den Stoffumsatz pro Zeiteinheit berechnen kann, ist die Eichung mit einer EDANS-Lösung bekannter Konzentration nötig.

Mit dem Programm Flukin49 wurden v_0 und v_i (entspricht dem durchschnittlichen Stoffumsatz in nM pro Minute ohne und mit Inhibition) durch Auswertung der in Flukol4 gespeicherten Daten ermittelt.

2.4.3. Aktivitätsmessung der Protease im Mikrotiterplattenformat

2.4.3.1. Allgemeines

Während der Herstellung der HIV-Protease aus Patientenmaterial fand die Etablierung der Aktivitätsmessung der Protease im Mikrotiterplattenformat statt (Hoffmann et al., 2001). Damit wurde ein höherer Probendurchsatz als im Küvettenformat ermöglicht. Die Messungen der hier vorliegenden Arbeit erfolgten im Fluorometer FL 600 (Biotek-Kontron, Neufahrn) in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden (Corning, Wiesbaden).

Für die Exzitation wurde im Gerät ein Filter mit 360 nm Wellenlänge bei 40 nm Bandbreite, für die Emission ein Filter mit 485 nm Wellenlänge bei 20 nm Bandbreite eingesetzt.

Die Steuerung der Messung erfolgte mit der Software KC4. Folgende Voreinstellungen wurden vorgenommen:

Anzahl der Messungen pro Well und Messdurchgang: 10 Messungen pro Well (KC4 bildet aus den gewonnenen Werten den arithmetischen Mittelwert)

Zeit zwischen der Plattenbewegung und Beginn der Messung: 0,35 s

Sensitivität des Photomultipliers: 170 (gültig für Mikrotiterplatten mit transparentem Boden). Bei dieser Einstellung lagen die Grenzen des Fluoreszenzsignals bei der Verwendung von 1000 nM EDANS und 10 μ M Substratlösung zwischen 0 und 99999 Fluoreszenzeinheiten (FU).

Reaktionstemperatur: 30 °C.

Die jeweiligen v_i wurden im Doppelansatz ermittelt. Der Wert für v_0 wurde im Fünffachansatz gewonnen. Der Stoffumsatz lag zwischen 10 und 30 nM/Minute.

2.4.3.2. Versuchsdurchführung

Für den Versuchsansatz wurden die Reaktionslösungen in Eppendorfgefäße vorgelegt und anschließend je 200 μ l in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt. 90 % des Endvolumens machte dabei Assay Puffer aus, die restlichen 10 % setzten sich aus Substrat (10 μ M), PI-Stocklösung (jeweils gelöst in DMSO) und reinem DMSO zusammen. Wie schon beim Küvettenansatz musste gewährleistet sein, dass sich jeweils die gleiche Menge an DMSO im Reaktionsansatz befand, da DMSO die Aktivität der Protease in gewissem Umfang herabsetzt. Dann wurde die Proteaselösung zugegeben und der Messvorgang gestartet.

V_i wurde für 4 - 5 Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen wurden wie im Küvettenformat so angepasst, dass sensible bzw. resistente Proteasen in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt wurden, um die Berechnung des K_{is} zu gewährleisten. Auf einer Mikrotiterplatte konnte so die phänotypische Resistenz gegenüber den 6, zur Zeit der Testdurchführung verfügbaren, PIs ermittelt werden.

2.4.3.3. Erstellung einer EDANS-Eichgerade

Um aus der Zunahme des Fluoreszenzsignals den Stoffumsatz zu ermitteln, wurde aus unterschiedlichen Konzentrationen des Fluorophors EDANS eine Eichkurve erstellt.

Um ähnliche Bedingungen wie im Reaktionsansatz herzustellen, wurde den EDANS-Verdünnungen 10 μ M Substrat und 10 % DMSO zugegeben. Die einzelnen EDANS-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie den Bereich des zu erwartenden Stoffumsatzes von 0 - 2000 nM abdeckten. Da die Zunahme des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Zunahme der EDANS-Konzentration ist, kann mit Hilfe der Steuerungs- und Auswertungssoftware KC4 eine möglichst gut angepasste Gerade erstellt werden. Der lineare Zusammenhang wird durch die Formel

$$\Delta F = m \cdot \Delta c (\text{EDANS})$$

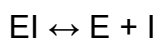
dargestellt. ΔF ist die Zunahme des Fluoreszenzsignales, Δc symbolisiert die Zunahme der EDANS-Konzentration und m ist die Steigung der Eichgeraden.

Mit Hilfe der aus der Eichgeraden gewonnenen Daten kann über die Auswertefunktion von KC4 v_i/v_0 ermittelt werden. Zusammen mit der dazugehörigen PI-Konzentration wurden diese Quotienten zur enzymkinetischen Auswertung in das Kurvenanpassungsprogramm FigureP eingegeben.

2.4.3.4. Theoretische Grundlagen der Enzyminhibition

Die Interaktion zwischen HIV-Protease und PI ist gekennzeichnet durch eine reversible Bindung. Bei dieser Bindungsart ist das Enzym nicht-kovalent gebunden und kann deshalb wieder leicht vom Inhibitor entfernt werden, z.B. auf physikalischem Weg durch Dialyse.

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



Die Lage dieses Gleichgewichtes wird durch die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i (=Inhibitionskonstante) bestimmt:

$$K_i = [E] \times [I] / [EI]$$

Zur Berechnung des K_i 's wurde in der vorliegenden Arbeit die allgemeine Gleichung für kompetitive, festbindende Inhibitoren verwendet (Morrison, 1969):

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[Et] + [It] + K_{iapp} - \{([Et] + [It] + K_{iapp})^2 - 4[Et] \times [It]\}^{0,5}}{2[Et]}$$

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

v_0 = Geschwindigkeit des Stoffumsatzes ohne Inhibition, gemessen als $\Delta [\text{Produkt}] / \text{min}$

$[Et]$ = Gesamtkonzentration des Enzyms (frei und im Komplex gebunden)

[It] = Gesamtkonzentration des Inhibitors (frei und im Komplex gebunden)

Kiapp = scheinbare Dissoziationskonstante/Inhibitionskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei einer bestimmten Substratkonzentration

Kompetitive Inhibitoren, zu denen die verwendeten PIs gehören, binden an das aktive Zentrum des Enzyms und konkurrieren dabei mit dem natürlichen Substrat um die Bindungsstellen. Bei festbindenden Inhibitoren beträgt das Verhältnis $[Et] / K_i \approx 1$. Diese Situation entspricht Gleichgewichtsbedingungen, das heißt, der Inhibitor liegt ungefähr zu gleichen Teilen ungebunden bzw. an Enzym gebunden vor.

Die scheinbare Inhibitionskonstante Kiapp verhält sich zur tatsächlichen Inhibitionskonstante Ki folgendermaßen:

$$K_{iapp} = K_i (1 + [S]_0 / K_m)$$

Km = Michaeliskonstante. Km entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der bei konstanter Enzymmenge die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird.

Die Substratkonzentration (= [S]0) liegt deutlich unter dem für die WT-HIV-Pr ermittelten Km von 80,3 µM. [S]0 ist ebenfalls kleiner als die für eine Patienten-Pr ermittelte Michaeliskonstante von 51,9 µM (Hoffmann, 2002). In der Literatur wird die Km für die WT-HIV-Pr mit 103,2 µM angegeben (Matayoshi et al., 1990). Aufgrund dieser Daten kann Kiapp mit dem Ki gleichgesetzt werden, was die Voraussetzung für die Benutzung der allgemeinen Gleichung für festbindende Inhibitoren bei der Auswertung der enzymkinetischen Daten (siehe oben) ist.

2.4.3.5. Bestimmung der Inhibitionskonstanten (Ki) des Enzym-Inhibitor-Komplexes mit Hilfe des Kurvenanpassungsprogrammes Figure P

Zur Berechnung der Inhibitionskonstanten Ki wurden die Wertepaare v_i/v_0 und die dazugehörigen Inhibitorkonzentrationen für die einzelnen PIs in das Kurvenanpassungsprogramm Figure P eingegeben. Wie in 2.4.3.4. beschrieben, entspricht v_i dem gehemmten und v_0 dem nicht gehemmten Stoffumsatz. Die Bestimmung von Ki erfolgt in Figure P durch nichtlineare Regression unter Verwendung der in 2.4.3.4. aufgeführten Formel gültig für kompetitive, festbindende Inhibitoren. Diese Bindungs-

form wurde im Allgemeinen bei den durchgeführten enzymkinetischen Versuchen angenommen. Die Kurvenanpassung wurde mit einer als variabel, aber größer 0 gesetzten Enzymkonzentration durchgeführt. Figure P wählt hier sowohl K_i als auch E_t frei.

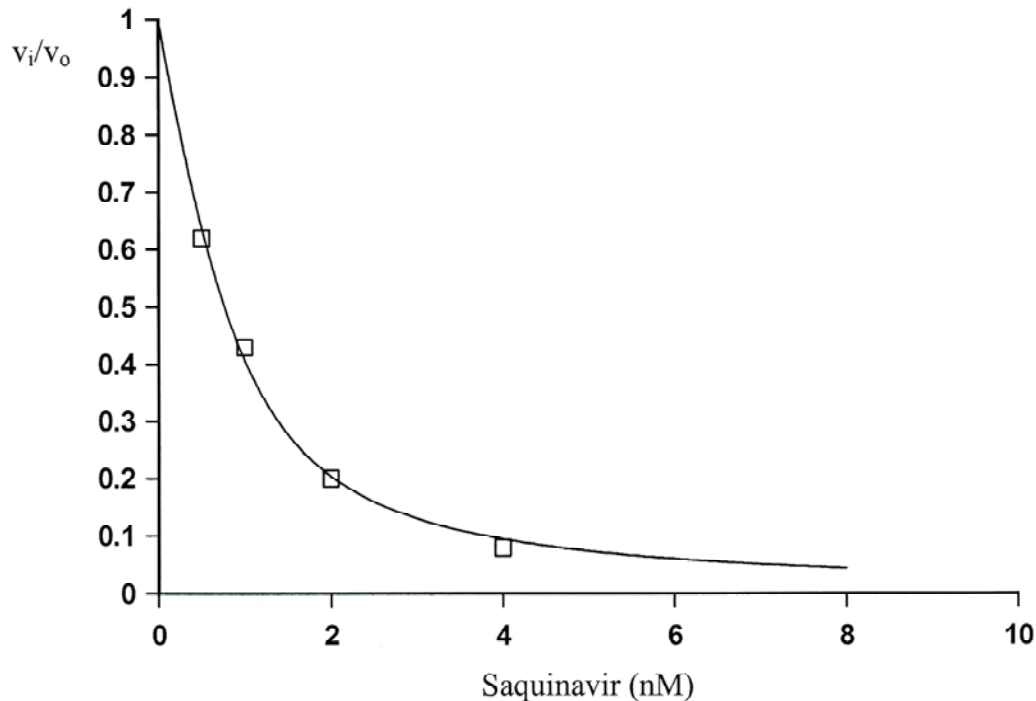


Abb. 4 Kurvenanpassung der enzymkinetischen Werte einer Patientenprotease, gehemmt mit dem PI Saquinavir

Die K_i -Werte für die Inhibitor-Patientenprotease-Komplexe wurden zur Ermittlung der Resistenzfaktoren herangezogen.

2.4.4. Berechnung der Resistenzfaktoren

Entsprechend der Bestimmung des Inhibitionsverhaltens der Patientenproteasen wurden Messungen mit verschiedenen Präparationen von WT-Proteasen durchgeführt. Aus den erhaltenen K_i 's wurde der Mittelwert gebildet. Zur Berechnung der Resistenzfaktoren wurden dann die K_i -Werte der Patientenproteasen durch die entsprechenden WT-Werte geteilt.

2.4.5. Vergleich mit genotypischen Resistenzergebnissen

Als Vergleichsdaten wurden die in der Diagnostik des Max-von-Pettenkofer Institutes unter der Leitung von PD Dr. med. J. Eberle erstellten genotypischen Resistenzprofile, gewonnen aus HIV-RNA im Plasma, herangezogen. Die Resistenzmuster wurden durch Sequenzierung der relevanten Genbereiche erstellt und mit Hilfe von online

verfügbaren geno- / phäno-typischen Datenbanken (geno-phäno; Stanford) interpretiert.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

Zur Lösung der eigentlichen Fragestellung, dem phänotypischen DNA-RNA-Vergleich, waren im Vorfeld Experimente nötig, die zum einen die Optimierung des phänotypischen Resistenztestes (PRT) und die Gegenüberstellung des älteren und des neueren enzymatischen Auswertemodus (RPC versus enzymkinetischer Fluoreszenztest) zum Ziel hatten. Zum anderen war es für den DNA / RNA-Vergleich erforderlich, eine DNA-Kontamination in der RNA-Extraktion auszuschließen, die Reproduzierbarkeit des angewandten Testsystems zu überprüfen und daraus folgend die technische Schwankungsbreite des Systems festzulegen. Des Weiteren mussten zur Bestimmung der Resistenzfaktoren der Patientenproteasen die Inhibitionskonstanten des Wildtyps ermittelt werden. Für den PI Lopinavir, der bisher im PRT nicht ausgewertet wurde, wurde ein, gegenüber den anderen PIs differentes, vorläufiges Auswerteverfahren festgelegt.

3.2. Verbesserung der Amplifikationseffizienz durch die Einführung neuer Primer in die 2. PCR

Die 2. PCR (entspricht der nested PCR) wurde anfangs mit den Primern P3 und P4 durchgeführt, die sich für die damalige phänotypische Resistenztestung als geeignet erwiesen (Gehring, 2002). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR-Versuchsansätzen war erstmals ein direkter Vergleich mit der parallel für die genotypische Resistenztestung durchgeführten nested PCR möglich, da die Primer der ersten PCR für die Geno- und Phänotypisierung identisch waren. So konnte die Amplifikationseffizienz bezogen auf die Primer der 2. PCR verglichen werden. Dabei kam es zu folgendem Ergebnis: Von insgesamt 20 durchgeführten nested PCRs waren im genotypischen Lauf 18 Patienten positiv, während beim Ansatz der nested PCR für den PRT mit den Primern P3 und P4 nur bei 14 Patienten eine Bande im Agarosegel sichtbar war. Da im phänotypischen Lauf die Amplifikationsrate also um 20% niedriger war als im genotypischen, wurde die 2. PCR auf den Forward-Primer der Genotypisierung umgestellt. Dabei waren einige Modifikationen nötig, um die Ligation in pBD2 und die rekombinante Expression zu gewährleisten: An den *neuen Forward-Primer P3D2* wurde deshalb die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI an-

gehängt. Zusätzlich musste darauf geachtet werden, dass die Sequenz der HIV-Protease im resultierenden PCR-Produkt in pBD2 im korrekten Leseraster liegt. Der Reverse-Primer konnte dagegen nicht durch den außerhalb des Proteasegenes liegenden Diagnostik-Primer ersetzt werden, da für die Produktion aktiver Protease das Stoppcodon am Ende der Protease-Sequenz essentiell ist, und der Primer deshalb an deren 3'-Ende binden muss. Die Sequenz des Reverse-Primers wurde allerdings um 3 Nukleotide in die Proteaseregion hinein verlängert, um die Anlagerungsfähigkeit aufgrund des A/T-Reichtums dieser Hybridisierungsregion zu verbessern. Damit werden Mutationen in der HIV-Protease bis einschließlich der 92. Aminosäure erfasst, die restliche Aminosäuresequenz ist durch den neuen Reverse-Primer P4M festgelegt. Nach dem bisherigen Wissenstand ist aber nicht davon auszugehen, dass in dem für die Sequenzanalytik damit nicht mehr zugänglichen Proteasebereich relevante Resistenzmutationen vorkommen (Miller, 2001). Mit dem neuen Primerpaar P3D2 und P4M wurden mit denen des genotypischen Ansatzes vergleichbare PCR-Ergebnisse erreicht. Die verwendeten Primer sind im Folgenden dargestellt:

FORWARD-PRIMERP3 (5'→3')CGC GGA TCC* GGC CTT CCT ACA AGG
GAA G*Schnittstelle BamHIDiagnostik-Primer 5GAG138 (5'→3')

CTT CAG AGC AGA CCA GAG

P3D2 (5'→3')neuCGG GGA TCC* TTC AGA GCA GAC CAG
AG*Schnittstelle BamHI**REVERSE-PRIMER**P4 (5'→3')GCC AAG CTT* TCA AAA ATT TAA AGT GCA
ACC*Schnittstelle HindIII**TCA=Stoppcodon**P4M (5'→3')neuGCC AAG CTT* TCA AAA ATT TAA AGT GCA
ACC AAT*Schnittstelle HindIII**TCA=Stoppcodon**

3.3. Vergleichende Messungen: RPC-Analyse und Fluoreszenztestung

Die enzymatische Auswertung der hier durchgeführten PRT wurde anfänglich mit Hilfe der Reversed Phase Chromatographie (RPC) durchgeführt (Gehring et al.,

2001). Die Entwicklung des enzymkinetischen Tests mit einem fluoreszierenden Substrat fand im Anschluss an die Arbeit von Gehringer statt (Hoffmann, 2002). Dieser Fluoreszenztest konnte für die vorliegende Arbeit verwendet werden. Neben der Methodik unterscheiden sich die beiden Verfahren im verwendeten Substrat. Während die Spaltstelle des für die Chromatographie-Analyse verwendeten Substrates der natürlichen Spaltstelle direkt nach dem Capsid-Protein (zwischen bp363 und bp364 im gag/gag-pol-Precursor) entspricht, besitzt das Fluoreszenzsubstrat eine Analogie zu einer anderen Spaltstelle, die zwischen dem Matrix- und dem Capsidprotein liegt. Ein Nachteil der chromatographischen Analyse ist, dass es sich hierbei nur um eine Ein-Punkt-Messung handelt und die PI-Konzentrationen für die IC_{50} -Bestimmung nur annäherungsweise ohne Verwendung einer Formel ermittelt werden konnten. In der Arbeit von Hoffmann (2002) wurden einige HIV-1-Protease-Präparationen, von denen auf RPC-Analyse basierende Resistenzergebnisse vorlagen (Gehringer, 2001), mit der neuartigen Fluoreszenztestung untersucht. Die verwendeten Proteasen hatten mindestens 12 Aminosäureaustausche und wurden gegenüber den meisten Proteaseinhibitoren durch die Genotypisierung und RPC-Analyse als resistent eingestuft. In seiner Arbeit kam Hoffmann mit Hilfe des Fluoreszenzassays zu ähnlichen, gut reproduzierbaren Werten, wobei die auf Resistenz hinweisenden Resistenzfaktoren höher waren als bei der RPC und mehr mit der genotypischen Resistenzinterpretation korrelierten. Sensitive bzw. sensitiv-intermediäre Resistenz gegenüber PIs wurde durch die Fluoreszenzanalyse aber auch als solche erkannt. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass der Fluoreszenztest gegenüber der RPC-Analyse eine höhere Sensitivität aufweist (Hoffmann, 2002). Um die Gültigkeit dieser Aussage zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei weitere, rekombinant exprimierte Proteasen, die genotypisch sensitiv bis resistent eingeschätzt wurden, sowohl mit der Chromatographie als auch der Fluoreszenztestung enzymkinetisch untersucht.

PI	Pat. 3/ RFFluoreszenz	Pat. 3 / RFRPC	Pat. 3 / RGenotypisierung
Amprenavir	1,2	1	empfindlich-intermediär
Indinavir	2,7	1	intermediär-resistent
Nelfinavir	2,8	1	resistent
Ritonavir	2,0	1	intermediär-resistent
Saquinavir	6,3	1	resistent
PI	Pat. 4/RFFluoreszenz	Pat. 4/RFRPC	Pat. 4/RGenotypisierung
Amprenavir	4,3	1	empfindlich-intermediär
Indinavir	4	1	intermediär-resistent
Nelfinavir	4	1	resistent
Ritonavir	3,4	1	intermediär-resistent
Saquinavir	8,2	1	resistent
PI	Pat. 6/RFFluoreszenz	Pat. 6/RFRPC	Pat. 6/RGenotypisierung
Amprenavir	1,3	1	empfindlich
Indinavir	1,2	1	empfindlich
Nelfinavir	1,6	1	empfindlich
Ritonavir	1,4	1	empfindlich
Saquinavir	1,1	1	empfindlich

Tab. 6 Gegenüberstellung der Resistenzergebnisse der verschiedenen Testverfahren bei Patient 3, 4 und 6; RF = Resistenzfaktor; R = Resistenz

Folgerung:

Bei den durchgeführten Untersuchungen bestätigt sich die Aussage von Hoffmann, dass mit dem Fluoreszenzassay eine bessere Differenzierung der Resistenzwerte möglich ist. Deshalb wurde das Resistenzverhalten der Patientenproteasen mit diesem neuen Verfahren in der vorliegenden Arbeit untersucht.

3.4. Ermittlung der DNA-Kontamination in RNA-Extraktionen

Für den Vergleich der phänotypischen Resistenzergebnisse aus DNA und RNA musste zunächst die RNA-Extraktion auf eine mögliche DNA-Kontamination untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die PCR (2.2.5.2.) ohne vorherige Reverse Transkription durchgeführt (2.2.5.3.) und die Proben anschließend im Agarosegel elektrophoretisch analysiert (nicht gezeigt).

Eine DNA-Kontamination in der RNA-Population hätte die durch RT produzierte und PCR amplifizierte cDNA verfälscht und nicht interpretierbare Daten ergeben (eine Verunreinigung kann durch austretende DNA aus Zelldetritus oder DNA aus intakten, trotz Abzentrifugation im Ansatz verbliebenen Zellen hervorgerufen werden).

Von insgesamt 33 auf Kontamination getesteten Patientenproben war bei zweien eine deutliche DNA-Kontamination feststellbar. Diese wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.5. Technische Variationsbreite bei der Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_i

Zur Beurteilung von Unterschieden zwischen dem phänotypischen Resistenzmuster der HIV-Protease aus DNA und RNA ist die Kenntnis des technischen, d.h. durch den Herstellungsprozess und Messansatz bedingten, Variationsfaktors nötig. Dazu wurden jeweils zeitlich versetzt Doppelansätze aus Wildtyp- bzw. Patientenproben durchgeführt. Außerdem wurden die vergleichenden Ansätze an unterschiedlichen Stellen des Testes begonnen: unter Einbezug der Proteaseherstellung aus identischem Patientenmaterial ab RNA-Extraktion (siehe 2.2.4.2.) bzw. der 2. PCR (siehe 2.2.5.2.) und ab der Fluoreszenztestung (siehe 2.4.2.). Der jeweils ermittelte größere Wert wurde durch den Minimalwert dividiert, um den Faktor der Testschwankung zu errechnen.

3.5.1. Testdurchführung im Küvettenformat

3.5.1.1. Schwankungsfaktoren ab RNA-Extraktion

Aus dem Patientenserum P6 wurde sequentiell an unterschiedlichen Tagen dreimal HIV-RNA extrahiert. Die K_i 's der gewonnenen Proteasen wurden zur Ermittlung der Variationsbreite der Dissoziationskonstanten des gesamten Testablaufes miteinander verglichen. Diese Messungen wurden im Küvettenformat durchgeführt.

PI	Ki/P6-1	Ki/P6-2	Ki/P6-3
Amprenavir	0,4	0,26	0,23
Indinavir	0,3	0,17	0,13
Nelfinavir	0,54	0,49	0,41
Ritonavir	0,36	0,25	0,23
Saquinavir	0,090	0,057	0,075

3.5.1.2. Faktor der Schwankungsbreite ab 2. PCR

Von zwei weiteren Patientenproben wurde aus dem Produkt der 1. PCR HIV-Protease in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen exprimiert und im Küvettenformat gemessen.

PI	Ki/P12-1	Ki/P12-2	Ki/P13-1	Ki/P13-2
Amprenavir	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Indinavir	0,34	0,51	0,13	0,13
Nelfinavir	0,62	1,1	0,27	0,3
Ritonavir	0,28	0,31	0,19	0,19
Saquinavir	0,18	0,063	0,045	0,12

3.5.1.3. Schwankungsfaktor ab Fluoreszenzmessung

PI	Ki/PC/DNA-1	Ki/PC/DNA-2
Amprenavir	1,7	1,5
Ritonavir	30	35
LopinavirIC50	1,2	0,9

3.5.2. Testdurchführung im Mikrotiterplattenformat: Schwankungsfaktoren ab Fluoreszenzmessung

WT(Wildtyp)-Messung auf Ursprungsgerät

PI	Ki/WT 5.5-1	Ki/WT 5.5-2
Amprenavir	0,14	0,1
Indinavir	0,87	0,81
Nelfinavir	1,5	1,2
Ritonavir	0,08	0,07
Saquinavir	0,28	0,1
LopinavirIC50	0,375	0,375

WT-Messung auf Leihgerät

PI	Ki/Wt 9.6	Ki/Wt 899
Amprenavir	0,14	0,14
Indinavir	0,71	1
Nelfinavir	1,3	1,3
Ritonavir	0,11	0,08
Saquinavir	0,21	0,23
Lopinavir IC50	0,375	0,375

WT-Messung auf repariertem Ursprungsgerät

PI	Ki/Wt 9.6	Ki/Wt 899
Amprenavir	0,1	0,09
Indinavir	0,87	0,97
Nelfinavir	0,85	0,79
Ritonavir	0,048	0,06
Saquinavir	0,17	0,22
Lopinavir IC50	0,275	0,350

Messung von Patientenproteasen

PI	Ki/P24RNA-1	Ki/P24RNA-2	Ki/P24DNA-1	Ki/P24DNA-2
Amprenavir	0,73	0,86	0,09	0,12
Indinavir	9,8	9,4	0,88	1,1
Nelfinavir	7,0	7,2	1,4	2,1
Ritonavir	0,50	0,76	0,05	0,11
Saquinavir	0,31	0,32	0,21	0,23
Lopinavir IC50	0,5	0,5	0,25	0,25

3.5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die größten Schwankungsfaktoren für die einzelnen PIs bezogen auf das Küvetten- bzw. Mikrotiterplattenformat sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Proteaseinhibitor	Schwankungsfaktor / Küvettenformat	Schwankungsfaktor / Mikrotiterplattenformat
Amprenavir	1,4	1,4
Indinavir	2,3	1,4
Nelfinavir	1,8	1,5
Ritonavir	1,6	2,2
Saquinavir	2,9	2,8
LopinavirIC50	1,3	1,3

Der größte Schwankungsfaktor, der in den verschiedenen Ansätzen beobachtet wurde, war 2,9 für Saquinavir im Küvettenformat. Aufgrund der Tatsache, dass jeweils nur Doppelbestimmungen durchgeführt wurden und um einen Interpretationsfehler beim DNA-RNA Vergleich weitestgehend auszuschließen, wurde die Grenze der möglichen Schwankung der Testergebnisse für die vorliegende Arbeit auf den Faktor 3 festgesetzt. Dies gilt für die PIs Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. Eine Ausnahme bildet Lopinavir. Aufgrund des abweichenden Auswertungsmodus bei diesem PI, bei dem stabilere aber auch weniger sensitive Werte produziert werden, wurde hier ein maximaler Variationsfaktor von 2 festgelegt (siehe auch 3.7.).

3.6. Bestimmung der „Inhibitionskonstanten“ (K_i) der Wildtyp-Protease

Zur Berechnung des Resistenzfaktors ist die Kenntnis der Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Protease für die therapeutisch eingesetzten PIs nötig. Dafür wurden verschiedene Protease-Wildtyp-Präparationen hergestellt und das Inhibitionsverhalten im Fluoreszenzansatz gemessen. Da für die K_i -Bestimmung der Patientenproteasen sowohl das Küvetten- als auch das Mikrotiterplattenformat herangezogen wurde, wurden die jeweiligen Wildtyp- K_i 's für beide Formate bestimmt. Für den K_i des Küvettenansatzes wurden aus mehreren Versuchsansätzen jeweils 10-20 Messpunkte ermittelt und diese im Fig. P mit der Einstellung „variable Enzymkonzentration“ ausgewertet. Damit wurde eine möglichst genaue Berechnung der Inhibitionskonstanten gewährleistet. Zur Berechnung der Wildtyp-Inhibitionskonstanten im Mikrotiterplattenformat wurden Fluoreszenzmessungen mit 2 Protease-Präparationen durchgeführt. Aufgrund eines während den Versuchsreihen aufgetretenen Defektes des Messgerätes, fanden einige Messungen auf einem Leihgerät des gleichen Typs und einige

Messungen auf dem reparierten Fluorometer statt. Für jedes verwendete Gerät wurden die Dissoziationskonstanten des Wildtyps neu bestimmt, um eventuelle gerätbedingte Schwankungen auszuschließen. Die ermittelten und zur Berechnung herangezogenen Dissoziationskonstanten sind in folgender Tabelle dargestellt.

PI	Ki / Küvette	Ki / Mikrotiterplatte (vor Reparatur)	Ki / Mikrotiterplatte (Leihgerät)	Ki / Mikrotiterplatte (nach Reparatur)
Amp	0,21	0,22	0,14	0,096
Ind	0,17	0,96	0,86	0,92
Nel	0,30	1,5	1,3	0,82
Rit	0,20	0,096	0,095	0,054
Saq	0,065	0,25	0,22	0,20

Die auf den verschiedenen Mikrotiterplatten-Lesegeräten ermittelten Dissoziationskonstanten des Wildtyps zeigen eine relativ gute Übereinstimmung mit einer Streuung bis zu den Faktor 2,3 bei Amprenavir. Es wurde allerdings kein Mittelwert der verschiedenen Mikrotiterplattenergebnisse gebildet, sondern der jeweils ermittelte spezifische K_i für die Berechnung eingesetzt, um eventuell doch vorhandene gerätbedingte Testschwankungen in die Auswertung miteinzubeziehen. Im Vergleich zu den Werten des Küvettenformats ist der K_i für Amprenavir ähnlich und für Ritonavir niedriger, der K_i für Saquinavir, Nelfinavir und besonders Indinavir aber deutlich höher. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Berechnung der Resistenzfaktoren im Küvettenformat ebenfalls der unter gleichen Messbedingungen ermittelte K_i gewählt.

3.7. Enzymkinetische Auswertung des Inhibitionsverhalten von Lopinavir

Das im Methodenteil beschriebene Verfahren zur Auswertung des Inhibitionsverhaltens mit Hilfe der Dissoziationskonstanten K_i erwies sich für einen der verwendeten PIs, Lopinavir, als nicht probat. Da es sich bei Lopinavir um einen sehr potenten Inhibitor handelt (Sham et al., 1998), waren die für die WT-Protease ermittelten Dissoziationskonstanten zum Teil extrem niedrig und schlecht reproduzierbar mit Werten zwischen 0,02 und 0,1 nM. Aus dem durch das enzymkinetische Auswerteprogramm Figure P ermittelten Kurvenverlauf wird deutlich, dass die Kurve bereits zu Anfang steil abfällt, was verdeutlicht, dass der K_i nur ungenau ermittelt werden kann (siehe Abb. 5).

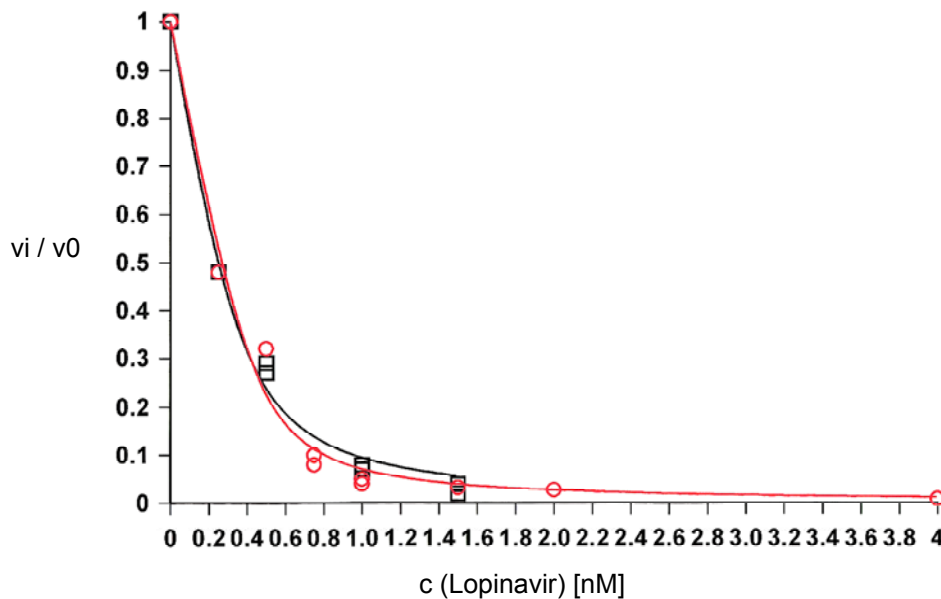


Abb. 5 Enzymkinetische Auswertung der Inhibition zweier Wildtyp-Proteasen (jeweils mit Kreisen bzw. Quadraten markiert) mit dem Proteaseinhibitor Lopinavir

Als praktikabler erwies sich der folgende Auswertungsmodus: Aus den erstellten Kurven wird diejenige Konzentration abgelesen, bei der v_i / v_0 gleich 0,5 ist. Dieser Wert entspricht der IC_{50} (inhibitorische Konzentration, bei der 50 % der Proteaseaktivität gehemmt sind). Die IC_{50} -Werte sind reproduzierbar, erreichen aber nicht die Sensitivität der K_i -Werte. Trotzdem konnte durch diesen Kompromiss eine Resistenzbeurteilung erfolgen.

Damit waren die vorarbeitenden Optimierungen der eigentlichen Methode abgeschlossen.

3.8. Phänotypische Resistenzanalyse von HIV-1 Patientenproteasen

3.8.1. Vergleich von DNA versus RNA als Ausgangsmaterial zur rekombinanten Herstellung der HIV Protease in Zusammenschau mit virologischen und pharmakologischen Daten

Im Folgenden sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt: die Gegenüberstellung des phänotypischen Resistenzprofils von HIV Proteasen, rekombinant hergestellt aus den Ausgangsmaterialien, entweder viraler HIV-RNA oder DNA aus PBMCs der gleichen Patienten-Blutprobe. Mögliche resultierende Unterschiede wurden mit weiteren virologischen Laborparametern wie der Viruslast und der CD4-

Zellzahl bzw. Informationen über die frühere und aktuelle antivirale Medikation, soweit verfügbar, verglichen.

Aufgrund verschiedener technischer Probleme, vor allem mit dem Patienten-Ausgangsmaterial, konnten für den Vergleich der Resistenz mit praktikablen DNA/RNA Paaren desselben Patienten nur 11 Patienten vollständig bewertet werden, ein 12. Patient nur teilweise. Die Viruslast dieser Blutproben lag zwischen 1900 und 230.000 HIV-RNA-Kopien cp/ml (gerundete Werte). Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, dass sowohl untere, mittlere bzw. hohe Viruslastbereiche vertreten waren, um einen möglichen Einfluß dieses virologischen Markers beurteilen zu können. Alle bis auf einen Patienten wiesen im zuvor durchgeführten genotypischen Test Resistenzmutationen auf, die die HIV-Protease betrafen (siehe 3.9.).

Im Vorfeld wurden die RNA-Extraktionen auf DNA-Kontamination untersucht. Es wurden nur diejenigen Proben weiterverwendet, die keine derartige Verunreinigung aufwiesen. Unterschiede wurden dann als solche anerkannt, wenn für die PIs Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir der Faktor 3 bzw. für Lopinavir der Faktor 2 (ermittelter technischer „cut-off“-Wert, siehe 3.5.3) zwischen dem DNA- und RNA-Resistenzfaktor überschritten wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung mit weiteren, den jeweiligen Patienten betreffenden Daten, sind nachfolgend aufgelistet. Relevante Daten sind **fett** gedruckt. Zusätzlich wurde bei festgestellten signifikanten Unterschieden neben der RNA auch die für die HIV-Protease kodierende DNA einer Nukleotid-Sequenzanalyse unterzogen, um festzustellen, ob die Unterschiede auch genetisch nachzuweisen sind (die sich daraus ergebenden relevanten Aminosäureaustausche sind unterhalb der jeweiligen Tabelle dokumentiert). Verwendete Medikamente wurden abgekürzt, der vollständige Name kann aus den Tabellen unter 1.3.1.1. und 1.3.1.2. entnommen werden.

Patient 3 (vom 26.09.2000):

Viruslast: **190.000 cp/ml** (Sept/2000)

CD4 positive T-Zellen: **248/µl** (Jan/2000); nächste CD4+-Zellbestimmung erfolgte erst wieder Jan/2001!

ART: April/1999 bis Feb/2000 **SQV** (+AZT/3TC); März/2000 bis Aug/2000 keine PI (AZT/3TC/ABC/Nev); Sep/2000 bis Dez/2000 IDV, RTV (+DDI/D4T)-Therapieumstellung erfolgte vor Blutabnahme

PI	RNA/Resistenzfaktor	DNA/Resistenzfaktor
Amprenavir	1,2	1
Indinavir	2,7	2,1
Nelfinavir	2,8	2,1
Ritonavir	2,0	1,3
Saquinavir	6,3	6,5

Patient 6 (vom 27.9.2000):

Viruslast: **4000 cp/ml** (Sept/2000)

CD4 positive T-Zellen: **n.d.**

ART: keine PI-beinhaltende Therapie (AZT)

PI	RNA/Resistenzfaktor	DNA/Resistenzfaktor
Amprenavir	1,4	1,9
Indinavir	1,2	2,4
Nelfinavir	1,6	2,5
Ritonavir	1,4	1,5
Saquinavir	1,1	1,5

Patient 7 (vom 08.11.2000)

Viruslast: **100.000 cp/ml** (Nov/2000)

CD4 positive T-Zellen: **50/µl** (Nov/2000)

ART: ab 11/2000 **RTV** und **LPV** (+Zerit); davor keine PI-beinhaltende HAART

PI / Patient 7	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	2,4	1,8
Indinavir	3,1	1,9
Nelfinavir	3,7	3,7
Ritonavir	2,0	1,5
Saquinavir	2,5	2,8

Patient 10 (vom 21.11.2000)Viruslast: **2900 cp/ml** (Nov/2000)CD4 positive T-Zellen: **291/µl** (Nov/2000)

ART: keine PIs in Therapie (NVP,d4T,ddl)

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	1,5	1
Indinavir	1,1	0,8
Nelfinavir	1	1,1
Ritonavir	0,9	0,8
Saquinavir	1,2	1,2
LopinavirIC50	1	1

Patient 16 (vom 07.12.2000)Viruslast: **3600 cp/ml** (Dez/2000)CD4 positive Zellen: **657/µl** (Dez/2000)

ART: keine PIs in Therapie (d4T, 3TC)

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	1,1	1,3
Indinavir	1,5	1
Nelfinavir	1,6	1,8
Ritonavir	1,2	0,6
Saquinavir	1,3	2
LopinavirIC50	1	1

Patient 20 (vom 20.11.2000)Viruslast: **9747 cp/ml** (Nov/2000)CD4 positive Zellen: **432/µl** (Nov/2000)Medikation: ab März/2000 **RTV, APV**, ddl, Sustiva; Juni/1996 bis März/2000 u.a. **IDV**

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	21	26
Indinavir	49	42
Nelfinavir	49	51
Ritonavir	81	91
Saquinavir	379	433
LopinavirIC50	2,7	2,7

Zusammenfassendes Resultat (Patient 3 - 20):

Die Resistenzmuster der entweder aus RNA oder DNA der Patienten 3, 6, 7, 10, 16 und 20 rekombinant hergestellten HIV Proteasen stimmen innerhalb der ermittelten experimentellen Varianz überein.

Patient 24 (vom 09.05.2001)

Viruslast: **1907 cp/ml** (Mai/2001)

CD4 positive Zellen: **927/µl** (Mai/2001)

ART: Jan/2000 bis Juli/2001 **keine PI-beinhaltende Therapie** (d4T, 3TC, NEV); Jan/1997-April/1999

IDV; [ab Juni 2001: u.a. SQV, RTV]

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA /Resistenzfaktor
Amprenavir	5,7	0,8
Indinavir	11,2	1,2
Nelfinavir	5,5	1,4
Ritonavir	6,6	0,8
Saquinavir	1,5	1
LopinavirIC50	1,3	0,7

Aminosäuren(AS)-Austausche DNA: M36I; L63A

AS-Austausche RNA: L10F; M36I; M46L; L63A; V82A

Resultat Patient 24: Die Resistenzmuster der HIV-Protease rekombinant hergestellt entweder aus RNA oder DNA stimmen für Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir und Ritonavir nicht überein.

Patient 7141 (vom 03.08.2001)

Viruslast: **23.000 cp/ml** (Aug/2001)

CD4 positive Zellen: **unbekannt**

ART: seit Okt/1998 Combivir und **NFV**; von Juli/1999 bis Aug/2001: ddl, d4T, EFV

PI	RNA/Resistenzfaktor	DNA/Resistenzfaktor
Amprenavir	5,1	1,9
Indinavir	12	2,1
Nelfinavir	16	3,3
Ritonavir	16	2,8
Saquinavir	17	2,1
LopinavirIC50	2,4	1,1

AS-Austausche DNA: G16E; K20I; M36I; L90M/L

AS-Austausche RNA: G16E; K20I; M36I; A71V; L90M

(Die Mutation A71V wird als Resistenzmutation für die PIs IDV, RTV, NFV angesehen; L90M als Resistenzmutation für die PIs SQV, IDV, RTV, NFV.)

Resultat Patient 7141: Die Resistenzmuster der HIV-Protease rekombinant hergestellt entweder aus RNA oder DNA stimmen für Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir und Lopinavir nicht überein.

Patient 6415 (vom 11.07.2001)

Viruslast: **6000 cp/ml**

CD4 positive Zellen: **597/µl**

ART: **SQV**, ddl, d4T (keine Angaben zum Zeitraum der Einnahme)

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	19	34
Indinavir	190	189
Nelfinavir	423	420
Ritonavir	494	635
Saquinavir	4160	3445
LopinavirIC50	5,2	5,5

Resultat Patient 6415: Die Resistenzmuster der HIV-Proteasen rekombinant hergestellt entweder aus RNA oder DNA stimmen innerhalb der experimentellen Varianz überein.

Patient B (vom 08.03.2001)

Viruslast: **38.800 cp/ml** (März/2001)

CD4 positive Zellen: **83/µl** (März/2001)

Medikation: bis 03.03.2001 (danach Therapiepause) **RTV, SQV, ABC**, ddl, d4T aber unregelmäßige Einnahme! Frühere ART: CBV, **keine PI**

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	23	14
Indinavir	117	74
Nelfinavir	92	40
Ritonavir	103	53
Saquinavir	930	272
LopinavirIC50	2,7	1,3

Resultat Patient B: Die Resistenzmuster der HIV-Proteasen rekombinant hergestellt entweder aus RNA oder DNA stimmen bis auf Saquinavir innerhalb der experimentellen Varianz überein.

Patient C (vom 13.03.2001)

Viruslast: **230.000 cp/ml** (März/2001)

CD4+-Zellen: **79/µl** (März/2001)

ART: 19.12.2000-21.08.2001 **LPV/RTV**, EFV, AZT, 3TC

Frühere PI-Medikation:

SQV Jan/1996 bis Jan/1998

IDV Juli/1998 bis März/1999

RTV Nov/1996 bis Feb/1997; Dez/1999-Okt/2000

NFV Jan/1998 bis Juli/1998

APV Dez/1999 bis Okt/2000

LPV/RTV Okt/2000 bis Nov/2000

PI	RNA / Resistenzfaktor	DNA / Resistenzfaktor
Amprenavir	35	8
Indinavir	58	48
Nelfinavir	70	67
Ritonavir	640	150
Saquinavir	95	66
LopinavirIC50	6,7	2,4

AS-Austausche DNA: L10I; K20R; M36I; M46I; V82A; L90M

AS-Austausche RNA: L10I; K20R; M36I; M46I; I50I/V; I54I/V; V82A; L90M

(Die Mutation I50V wird als Resistenzmutation für APV angesehen, I54V als Resistenzmutation für SQV; IDV; RTV.)

Resultat Patient C: Die Resistenzmuster der HIV-Proteasen, rekombinant hergestellt entweder aus RNA oder DNA, stimmen für die PIs Amprenavir, Ritonavir und Lopinavir nicht überein, also für PIs, die spät in der Behandlung verwendet werden. Die Diskrepanz der Resistenzergebnisse zwischen RNA und DNA bezüglich des PIs Ritonavir ist vergleichbar mit dem Missverhältnis der Resistenzergebnisse für Saquinavir bei Patient B.

3.8.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 3 der 11 untersuchten Patientenproben (Patient 24, Patient 7141 und Patient C) wurden signifikante Unterschiede in der phänotypischen Resistenz der HIV-

Proteasen zwischen RNA bzw. DNA als Ausgangsmaterial festgestellt. Diese Ergebnisse ließen sich durch die im Anschluss durchgeführte Nukleotid-Sequenzanalyse untermauern. Dabei wurden zusätzliche Mutationen in der RNA im Gegensatz zur DNA festgestellt. Möglicherweise liegt auch bei Patient B ein Unterschied in der Resistenz zwischen DNA- und RNA-Protease bezogen auf den PI Saquinavir vor. Der Varianz-Faktor 3,4 ist aber grenzwertig.

Am auffälligsten ist der Gegensatz bei der phänotypischen HIV-Proteaseresistenz zwischen DNA und RNA als Ausgangsmaterial aber bei Patient 24, dessen DNA Wildtyp-Eigenschaften zeigt, während die RNA gegenüber Amprenavir, Indinavir; Nelfinavir und Ritonavir resistent ist. Eine klare Abweichung zwischen den phänotypischen Resistenzmustern aus „RNA- und DNA-Protease“ zeigt sich auch bei Patient 7141. Hier sind die Resistenzfaktoren der „DNA-Protease“ im sensitiv/intermediären Bereich, wohingegen sich bei der „RNA-Protease“ signifikant resistente Werte für die PI Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir und Lopinavir finden. Bei Patient C zeigt sich sowohl für die DNA als auch die RNA eine deutliche Resistenz für alle PI. Allerdings sind die Resistenzfaktoren der RNA für Amprenavir, Ritonavir und Lopinavir deutlich höher.

3.9. Vergleich der phänotypischen Resistenzergebnisse aus HIV-RNA mit den genotypischen Daten

Von einigen, in 3.8.1. nicht aufgeführten Patienten, wurde ebenfalls die phänotypische Resistenz bestimmt, allerdings allein für die HIV-Protease, die aus HIV-1 RNA (aus Plasma) rekombinant hergestellt wurde. Parallel zu diesen und in 3.8.1. bereits dargestellten phänotypischen Daten wurden Resistenzdaten nach der genotypischen Methode ermittelt, ausgehend von RNA (bzw. konsekutiv cDNA) aus Patientenplasma. Da die angewandten geno- und phänotypischen Resistenzbestimmungen vom gleichen Produkt der 1. PCR ausgehen, können die gewonnenen Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden. Der Resistenzfaktor des phänotypischen Fluoreszenz-Resistenztestes (PRT) wurde über Division des ermittelten Kis durch den entsprechenden Ki des Wildtyps ermittelt. Im Folgenden sind tabellarisch 15 Befunde des PRT im Vergleich mit den genotypischen Befunden dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb der Tabelle die dazugehörigen Resistenzmutationen aufgeführt.

Pat. B	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	23	resistent
Indinavir	117	resistent
Nelfinavir	92	resistent
Ritonavir	103	resistent
Saquinavir	932	intermediär
LopinavirIC50	2,7	resistent

Mutationen für PI (Pat. B): L10F; K20R; M36I; M46I; I54T; L63P, A71V

Patient B: Die größte Diskrepanz findet sich bei den Ergebnissen des PIs Saquinavir, hier ist eine äußerst hohe Resistenz im PRT zu finden, während die Auswertung des Genotyps nur eine intermediäre Resistenz annimmt. Das in der Genotypisierung als resistent betrachtete Lopinavir, übersteigt im PRT den WT-Wert zwar nur um das 2,7-fache, aufgrund der geringeren Sensitivität des oben beschriebenen Auswertungsmodus dieses Proteaseinhibitors (siehe 3.7.) kann dieser Faktor tendenziell als resistent angesehen werden. Auch die Ergebnisse für die restlichen PIs sind kongruent.

Pat. C	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	35	resistent
Indinavir	58	resistent
Nelfinavir	70	resistent
Ritonavir	640	resistent
Saquinavir	95	resistent
LopinavirIC50	6,7	resistent

Mutationen für PI: L10I; M36I; K20R; M46I; I50I/V; I54I/V; V82A; L90M

Patient C: Die Ergebnisse des phäno- und genotypischen Resistenztestes stimmen überein.

Pat. 3	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	1,2	empfindlich-intermediär
Indinavir	2,7	intermediär-resistent
Nelfinavir	2,8	resistent
Ritonavir	2,0	intermediär-resistent
Saquinavir	6,3	resistent

Mutationen für PI: L10I/L; L63P; L90M

Patient 3: Eindeutige Übereinstimmung für Amprenavir, Indinavir, Saquinavir

Pat. 4	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	4,3	empfindlich-intermediär
Indinavir	4	intermediär-resistent
Nelfinavir	4	resistent
Ritonavir	3,4	intermediär-resistent
Saquinavir	8,2	resistent

Mutationen für PI: M36I/M; L63P; V77I; L90M

Patient 4: Kongruente Ergebnisse für Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir.

Pat. 6	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	1,3	empfindlich
Indinavir	1,2	empfindlich
Nelfinavir	1,6	empfindlich
Ritonavir	1,4	empfindlich
Saquinavir	1,1	empfindlich

Mutationen für PI: K20M; M36I

Patient 6: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 7	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	2,4	empfindlich
Indinavir	3,1	empfindlich
Nelfinavir	3,7	empfindlich
Ritonavir	2,0	empfindlich
Saquinavir	2,5	empfindlich

Mutationen für PI: L63S; V77I

Patient 7: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 10	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	1,5	empfindlich
Indinavir	1,1	empfindlich
Nelfinavir	1	empfindlich
Ritonavir	0,9	empfindlich
Saquinavir	1,2	empfindlich
Lopinavir	1	empfindlich

Mutationen für PI: keine

Patient 10: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 11	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Indinavir	0,7	empfindlich
Nelfinavir	0,9	empfindlich
Ritonavir	0,7	empfindlich
Saquinavir	0,4	empfindlich

Mutationen für PI: L63Q

Patient 11: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 12	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Indinavir	2,5	empfindlich-intermediär
Nelfinavir	2,9	empfindlich-intermediär
Ritonavir	1,5	empfindlich
Saquinavir	1,9	empfindlich-intermediär

Mutationen für PI: L10I; L63Q; V77I; I93L

Patient 12: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 13	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Indinavir	0,8	empfindlich-intermediär
Nelfinavir	1	empfindlich-intermediär
Ritonavir	1	empfindlich-intermediär
Saquinavir	1,3	empfindlich

Mutationen für PI: K20I; M36I; L63P; V82I

Patient 13: Patient im phänotypischen Test tendenziell empfindlicher als im Genotyp.

Pat. 16	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	1,1	empfindlich
Indinavir	1,5	empfindlich
Nelfinavir	1,6	empfindlich
Ritonavir	1,2	empfindlich
Saquinavir	1,3	empfindlich
LopinavirIC50	1	empfindlich

Mutationen für PI: M36I

Patient 16: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 20	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	21	resistent
Indinavir	49	resistent
Nelfinavir	49	resistent
Ritonavir	81	resistent
Saquinavir	379	resistent
LopinavirIC50	2,7	intermediär-resistent

Mutationen für PI: L10I; M46I; L63P; I84V; L90M

Patient 20: Übereinstimmende Ergebnisse für alle untersuchten PIs.

Pat. 24	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	5,7	intermediär
Indinavir	11,2	resistent
Nelfinavir	5,5	resistent
Ritonavir	6,6	resistent
Saquinavir	1,5	empfindlich-intermediär
LopinavirIC50	1,3	empfindlich-intermediär

Mutationen für PI: L10F; M36I; M46L; L63A; V82A

Patient 24: Bis auf Amprenavir kongruente Ergebnisse für die untersuchten PIs.

Pat. 7141	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	5,1	empfindlich
Indinavir	12	resistent
Nelfinavir	16	resistent
Ritonavir	16	resistent
Saquinavir	17	resistent
LopinavirIC50	2,4	intermediär

Mutationen für PI: G16E; K20I; M36I; A71V; L90M

Patient 7141: Bis auf Amprenavir kongruente Ergebnisse für die untersuchten PIs.

Pat. 6415	Resistenzfaktor/PRT-RNA	Resistenzbereich/Genotyp
Amprenavir	19	resistent
Indinavir	190	resistent
Nelfinavir	423	resistent
Ritonavir	494	resistent
Saquinavir	4160	resistent
LopinavirIC50	5,2	resistent

Mutationen für PI: L10I; K20I; M36I; L63P; A71V; G73S; I84V; L90M

zusätzlich Insertion im Proteasegen: 41-R-42

Patient 6415: Übereinstimmende Ergebnisse für die untersuchten PIs.

Zusammenfassung des Vergleichs der phäno- und genotypischen Resistenz- ergebnisse:

Durch die parallele, aber „blind“ durchgeführte genotypische Resistenztestung der HIV-RNA durch die diagnostische Abteilung des Max-von-Pettenkofer Institutes war eine unabhängige Validierung des PRT gewährleistet. Die in der phänotypischen Analyse erhobenen Daten aus RNA wurden dabei durch den Vergleich mit dem Genotyp weitestgehend bestätigt.

4. Diskussion

4.1. Ziel der vorliegenden Arbeit

Bei der vorliegenden Arbeit ging es um die Klärung der Frage, ob im phänotypischen Resistenzmuster von HIV-Proteasen, die entweder aus HIV-1 RNA oder DNA der gleichen Blutprobe eines Patienten rekombinant hergestellt wurden, Unterschiede bestehen. Daraus sollte dann abgeleitet werden, welches Untersuchungsmaterial für die Durchführung des phänotypischen Resistenztestes zukünftig am besten geeignet ist: entweder Plasma, aus dem die virale RNA gewonnen wird oder Vollblut, aus dessen PBMCs HIV-DNA extrahiert wird. Zudem sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast bzw. der Zahl der CD4 positiven Lymphozyten und dem Auftreten bzw. dem Fehlen von Unterschieden in der phänotypischen Resistenz existiert.

Die bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit publizierten Daten, die alle mit Hilfe von genotypischen Verfahren ermittelt wurden, waren teilweise widersprüchlich in ihren Erkenntnissen (Kroodsma et al., 1994; Wei et al., 1995; Kaye et al., 1995 vs. Schapiro et al., 1996 vs. Gunthard et al., 1998; Koch et al., 1999; Devereux et al., 2000).

4.2. Stand der Forschung

Im Folgenden wird die bisher zu diesem Thema veröffentlichte Literatur zusammengefasst und diskutiert. Zunächst die Vergleiche, inwieweit HIV-Protease (und Reverse Transkriptase) von therapierten Patienten unterschiedliche Mutationen in DNA vs. RNA aufweisen. Anschließend (4.3.) wird das sehr komplexe Gebiet der viralen Dynamik einer HIV-Infektion und die von der Infektion möglicherweise betroffenen Zellarten erörtert, die für die Interpretation der Ergebnisse eine Rolle spielen.

4.2.1. DNA vs. RNA-Vergleiche

In folgenden veröffentlichten Untersuchungen handelt es sich um Nukleotid-Sequenzanalysen der entsprechenden HIV Gene von DNA vs. RNA, also genotypische Analysen.

Zwei Forschungsgruppen berichteten, dass Mutationen zuerst in der HIV-1 RNA der Viren im Plasma zu finden waren und sich erst später in der proviralen DNA der PBMCs manifestierten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die provirale HIV-DNA

eine Archivierungsrolle innehat, die nach einem gewissen Zeitintervall die Sequenz der viralen RNA übernimmt (Kroodsma et al., 1994; Kaye et al., 1995). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine weitere Studie: Unter dem Selektionsdruck einer Monotherapie erwarb die ursprüngliche Wildtyp-Virus-RNA innerhalb von 4 Wochen in allen Patienten Resistenzmutationen, die zum Therapieversagen führten. Eine parallele Analyse der Nukleotidsequenzen der aus Patienten-PBMCs isolierten DNA nach 20 Wochen zeigte eine verzögerte und im Vergleich zur RNA nur eine 50- bis 80-prozentige Manifestationsrate dieser Resistenzmutationen. Die Viruslast der Patienten zu Therapiebeginn betrug im Schnitt $10^{5,5}$ cp/ml und stieg nach anfänglicher Reduktion wieder auf die ursprünglichen Werte an (Wei et al., 1995).

Im Gegensatz dazu wurde von einer anderen Arbeitsgruppe von simultan auftretenden Mutationen der Plasma-RNA *und* der proviralen DNA berichtet (Schapiro et al., 1996). Eine neuere Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen (Chew et al., 2005).

Weitere Studien bestätigten sowohl die eine als auch die andere Aussage: In einer Untersuchung von 5 Patienten zeigten zwei Patienten Unterschiede in der Resistenz gegenüber PR und / oder RT-Inhibitoren zwischen der plasmatischen HIV-RNA und der PBMC-DNA bzw. der RNA von Virusisolaten aus PBMC-Zellkulturen. Dabei fanden sich in der viralen RNA im Plasma mehr Mutationen als in der proviralen DNA der mononukleären Blutzellen bzw. deren Virusisolaten. Bei den restlichen 3 Patienten stimmten die Mutationen in allen untersuchten Kompartimenten überein. Die Patienten wiesen eine Viruslast zwischen 2.000 und 63.000 cp / ml auf und wurden mit einer Kombinationstherapie aus RT mit oder ohne PI-Inhibitoren behandelt (Gunthard et al., 1998).

Bei einer anderen, ebenfalls während einer Kombinationstherapie (mit PI) durchgeführten Studie, wurden Plasma-RNA vs. PBMC-DNA-Paare einer Nukleotid-Sequenzanalyse der PR-Region unterzogen. Die Resultate zeigten in 70 % der Fälle Übereinstimmung, in den restlichen 30% hingegen waren Primärmutationen bezogen auf die Proteasesequenz nur im Plasma und nicht in PBMCs zu finden. Die Viruslast der untersuchten 23 Patienten lag zwischen 400 und 2.630.000 cp/ml, wobei die patientenspezifischen Kopienzahlen nicht aufgeführt waren (Koch et al., 1999).

Zu noch anderen Ergebnissen kam eine weitere Studie: bei 12 zum Teil in hohem Maß therapieerfahrenen Patienten (keine Angabe zur Höhe der Viruslast) wurde eine wesentliche Korrelation zwischen dem genotypischen Resistenzmuster der Plasma-RNA und der PBMC-DNA festgestellt. Bei den zwar geringen, aber doch vorhande-

nen patientenspezifischen Unterschieden wurden überraschenderweise in 63% der Fälle mehr Mutationen in der PBMC-DNA als in der Plasma-RNA entdeckt, in 35% überwog die Zahl der Mutationen im Plasma. In den restlichen Fällen stimmten die Resistenzmuster überein. In der PBMC-DNA wurden in einigen Patienten Mutationen gefunden, die mit früheren Therapien in Zusammenhang gebracht werden konnten und in der RNA fehlten (Devereux et al., 2000). In Tab. 9 sind die Erkenntnisse der Veröffentlichungen zusammenfassend dargestellt.

Autor	Mutationsrate
Kroodsma et al., Kaye et al., Wei et al.	in RNA höher als in DNA
Schapiro et al., Chew et al.	in RNA (zum gleichen Zeitpunkt) gleich DNA
Gunthard et al.	in 2 Patienten: in RNA höher als in DNA in 3 Patienten: in RNA gleich DNA
Koch et al.	in 30% der Patienten: in RNA höher als in DNA in 70 % der Patienten: in RNA gleich DNA
Devereux et al.	in 63% der Patienten: in DNA höher als in RNA in 35% der Patienten: in RNA höher als in DNA

Tab. 7 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der zu Beginn der vorliegenden Arbeit publizierten DNA-RNA Vergleiche

4.2.2. Korrelation eigener Ergebnisse mit Literaturdaten

In der vorliegenden Arbeit wurde gleichzeitig HIV-DNA aus PBMCs bzw. HIV-RNA aus Plasma-Virionen aus dem Blut 12 HIV-infizierter Patienten isoliert und einer phänotypischen Resistenzanalyse gegenüber PI unterzogen. Die Viruslast der einzelnen Patienten lag zwischen 1.900 cp / ml bis 230.000 cp / ml. Bei der Gegenüberstellung der phänotypischen Resistenz in den beiden Kompartimenten zeigten sich in 3 von 12 Patienten signifikante Unterschiede in Form eines höheren Resistenzmusters in der RNA. Bei den übrigen 9 Patienten stimmte das Resistenzmuster für DNA und RNA weitgehend überein, wobei aus diesem Kollektiv ein weiterer Patient eine Diskrepanz zwischen DNA und RNA-Resistenz aufwies. Der Unterschied zwischen DNA- und RNA-Resistenz hob sich in diesem Fall aber nur leicht vom Faktor der festgesetzten technischen Schwankungsbreite ab.

Diese Resultate bestätigen die genotypisch erhobenen Analysen der Arbeitsgruppen von Gunthardt et al. (1998) und Koch et al. (1999).

Im Anhang ist die genotypische DNA vs. RNA-Analyse eines weiteren Patienten dargestellt, die erstaunlicherweise in der DNA mehr Resistenzmutationen aufweist als in

der RNA. Diese Beobachtung ist konform mit der Untersuchung von Devereux et al. (2000). Zu ähnlichen Resultaten kam eine neuere Studie von Sarmati et al (2003): Neben einer errechneten allgemeinen guten Korrelation zwischen der genotypischen Resistenz der DNA/RNA-Paare wurden Primärmutationen bei 8 von 32 Patienten ausschließlich in der DNA der PBMCs festgestellt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des hier vorliegenden DNA vs. RNA-Vergleiches (und die dazugehörigen Patientendaten), dass bei Patienten mit Therapieversagen DNA und RNA in der überwiegenden Anzahl übereinstimmende phänotypische Resistenzmuster aufweisen. In etwa 30 % der Fälle wurde allerdings eine Diskrepanz zwischen DNA und RNA festgestellt. Die DNA aus PBMCs wies (bis auf die o.g. Ausnahme) in diesen Fällen einen geringeren Resistenzgrad auf als virale Plasma-RNA.

Um die erhaltenen Daten in Korrelation zu den Patientenparametern adäquat interpretieren zu können, wird im Nachfolgenden erörtert, was über Ursprung, Lebensdauer und Reservoir-Verhalten von HIV-RNA (aus Plasma) und DNA aus PBMCs bekannt ist:

4.3. Ursprung der HIV-RNA im Patienten-Plasma und Beitrag zellulärer und anderer anatomischer Reservoirs zur Plasmavirämie

Der Hauptort der viralen Replikation von HIV ist das periphere (=sekundäre) lymphatische Gewebe. Die Replikation läuft vor allem in den Lymphknoten ab. Wenn die Bindungskapazität der folliculären dendritischen Zellen überschritten ist, treten Viruspartikel ins Blut über. Aber auch die Milz und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe sind an der Virusproduktion beteiligt. Das Virus wird i.d.R. von frisch infizierten aktivierten CD4 positiven T-Lymphozyten gebildet, bei denen nach Infektion besonders schnell virale Replikation und nachfolgende Virusproduktion nachzuweisen ist (Finzi, 1998). Die Halbwertszeit der Virionen beträgt 6 Stunden oder weniger, während die Halbwertszeit der virusproduzierenden (= produktiv-infizierten) Zellen bei 1,6 Tagen liegt. Die Generationszeit ist die Zeit, die das HI-Virus vom Verlassen der Zelle bis zur produktiven Infektion neuer Zellen und der erneuten Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt, diese beläuft sich auf etwa 2,6 Tage (Perelson et al; 1996). Produktiv-infizierte CD4 Zellen des peripheren lymphatischen Gewebes stellen damit (bei fehlender viralen Suppression) den Grossteil der Virionen im Plasma, aus denen die für die vorliegende Arbeit untersuchte HIV-RNA gewonnen wurde.

Zudem kann HIV-Persistenz vor allem unter HIV-Therapie in bestimmten Organ- und Gewebekompartimenten, besonders im zentralen Nervensystem und im Genitaltrakt, daneben auch in der Retina und den Epithelzellen der Nierentubuli, nachgewiesen werden (Schrager und D'Souza, 1998; Chun et al., 2000; Zhang et al., 2000; Pomerantz, 2002; Ghosn et al., 2004; Lambotte et al., 2005). Erklärt wird die Existenz dieser Reservoirs vor allem mit der schlechten Penetrationsfähigkeit antiretroviraler Substanzen in diese Kompartimente. Mutationsereignisse des HI-Virus können dort getrennt vom lymphatischen Gewebe ablaufen. So ist die Entstehung differenter Virusvarianten möglich, die dann auch ins Blut übertreten und so detektiert werden können.

Chronisch-infizierte Makrophagen, die Abkömmlinge der Monozyten im Gewebe, stellen ein weiteres relativ großes Reservoir von HIV im Körper dar, das signifikant zur Virusproduktion und -freisetzung beiträgt (Orenstein et al., 1997; Chun et al., 2000; Zhang et al., 2000; Aquaro et al., 2002). Diese Makrophagenpopulation wird deshalb auch als persistent-infiziert bezeichnet. Aufgrund ihrer relativen Unempfindlichkeit gegenüber den zytopathischen Effekten des HI-Virus besitzen sie eine relativ lange Lebensdauer (Aquaro et al., 2002). Ihre Halbwertszeit wird auf 0,5 bis 1 Monat geschätzt (Perelson et al., 1997; Young und Kuritzkes, 1999). Da, wie in der Einleitung erwähnt, höhere Inhibitor Dosen zur Suppression der viralen Replikation in Makrophagen nötig sind als in Lymphozyten, könnten mangelnde Compliance, suboptimale Wirkstoffmengen oder eine Therapieunterbrechung dazu führen, dass die Virusproduktion und -freisetzung in Makrophagen signifikant zur Plasmavirämie beiträgt.

Zu einem sehr geringen Anteil wird HIV auch von infizierten Zellen im Blut gebildet. Allerdings spielt diese Zellpopulation für die Plasmavirämie nur eine untergeordnete Rolle, da aufgrund der oben erwähnten kurzen Halbwertszeit wahrscheinlich nur wenige produktiv-infizierte Zellen nach der Infektion in die Zirkulation gelangen (Wei et al., 1995; Haase et al., 1997; Finzi und Siliciano, 1998; Furtado et al., 1999).

Schlussfolgerung:

Die Hauptmenge der HI-Viren repliziert mit kurzer Halbwertszeit (weniger als 6 Stunden) im lymphatischen Gewebe. Davon tritt ein kleiner, aber repräsentativer Teil ins Blut über. RNA-Mutationen lassen sich so schnell und direkt erfassen. Ein kleiner Teil der Viruspopulation (der unter suboptimaler antiviraler Suppression relativ größer

werden kann) repliziert in wesentlich längeren Halbwertszeiten in verschiedenen Reservoirs. Entstehende Mutationen können erst später festgestellt werden.

4.4. Ursprung der HIV-DNA

Die „Verlaufsgeschichte“ von HIV kodierender DNA in Patienten ist erheblich komplexer als die der RNA.

Wie im Methodenteil (2.1.3.1) beschrieben, wurde die DNA für den phänotypischen Resistenztest der vorliegenden Arbeit aus Patienten-PBMCs isoliert. Diese DNA können die im Folgenden aufgeführten HIV-infizierten mononukleären Zellen des peripheren Blutkreislaufs enthalten:

4.4.1. Aktivierte, produktiv-infizierte, CD4 positive T-Lymphozyten

Deren Anteil ist wahrscheinlich gering, da sich diese Zellen hauptsächlich in den Lymphknoten befinden und, wie in 4.3 beschrieben, eine sehr kurze Lebenszeit aufweisen. Sie treten deshalb kaum ins Blut über (Haase et al., 1997; Finzi und Siliciano, 1998). Auch die Anzahl der erst im Blutkreislauf infizierten, aktivierten Zellen, die dort konsekutiv Virus produzieren, ist wahrscheinlich vernachlässigbar klein. In einer älteren Studie betrug bei behandelten Patienten mit einer niedrigen, aber nachweisbaren Viruslast von ca. 1.000 cp / ml der Anteil der aktivierten virusproduzierenden Zellen im Blut an der Gesamtzahl der Helferzellpopulation < 0,002 % (Finzi et al., 1997).

4.4.2. Ruhende und aktivierte CD4 positive T-Lymphozyten mit nicht-integrierter HIV-DNA

Diese Zellpopulation entsteht hauptsächlich durch Kontakt von ruhenden (sowohl immunologisch naiven als auch Gedächtnis-) T-Helferzellen mit HIV. Ruhende CD4 positive T-Lymphozyten machen mit über 98 % den größten Teil der CD4 positiven T-Lymphozytenpopulation aus. Die Virus-RNA wird hier zwar nach der Viruseinschleusung in die Zelle in DNA umgeschrieben, aber aufgrund der fehlenden Aktivierung nicht ins Wirtsgenom integriert. Damit ist keine Produktion von HIV-Partikeln möglich. Diese Zellen werden auch als abortiv-infiziert bezeichnet, da festgestellt wurde, dass sie nach Rückkehr in den Lymphknoten eine erhöhte Apoptoserate aufweisen (Wang et al., 1997; Wang, 1999; Kirschner et al., 2000). Es wird angenom-

men, dass viele der abortiv-infizierten CD4 positiven T-Zellen 1 - 2 Tage im Blutkreislauf zirkulieren.

Unintegrierte (extrachromosomale) DNA ist wahrscheinlich weniger stabil als integrierte. Die Lebensdauer der betroffenen Zellen ist deshalb wahrscheinlich kürzer als die der später beschriebenen latent-infizierten Zellen mit integriertem Provirus (siehe 4.4.3.), da nicht-integrierte DNA bzw. der Präintegrationskomplex bei fehlender Aktivierung nach einigen Tagen degradiert wird (Zack et al., 1990; Spina et al., 1995; Finzi und Siliciano, 1998; Zhou et al., 2005).

In einem untherapierten asymptomatischen Patientenkollektiv betrug der Anteil an HIV-infizierten CD4 positiven T-Lymphozyten (im aktivierten und ruhenden Zustand) im Blut 0,07 % bis 0,4 %. Zwischen 50 % und 88 % dieser Zellen enthielten extrachromosomale DNA. Bei Patienten mit AIDS hingegen stieg Zahl der Zellen mit integrierter DNA (Bukrinsky et al., 1991).

In einer weiteren Studie dominierte in aktivierten CD4 positiven T-Zellen (die allerdings neben den ruhenden die Minderheit ausmachen) ebenfalls die unintegrierte, replikations-inkompetente DNA-Form (Chun et al., 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die nicht-integrierte HIV-DNA in CD4 positiven T-Lymphozyten in untherapierten Patienten überwiegt und damit die Rate der im folgenden Punkt aufgeführten proviraler DNA in latent-infizierten Zellen *übertrifft* (Bukrinsky et al., 1991; Chun et al., 1997). Damit stellt diese Fraktion (vor allem bei aktiver HIV-Replikation im Rahmen einer fehlenden oder ineffektiven Therapie) mit großer Wahrscheinlichkeit im Blutkreislauf den Hauptanteil der zellulären aktuellen Viruspopulation und damit der DNA in den PBMCs dar, die bei den Testen mit PCR amplifiziert wird.

4.4.3. Ruhende CD4 positive Gedächtniszellen mit integrierter DNA/latent-infizierte Zellen

Retrovirale Latenz zeichnet sich durch die Existenz eines integrierten Provirus in den infizierten Zellen aus, der erst nach einer entsprechenden (meist immunologischen) Aktivierung transkribiert wird. Diese Form der viralen DNA findet sich in Helferzellen mit Gedächtnisfunktion. Hervorgegangen sein könnten diese Zellen aus ursprünglich aktivierten, produktiv-infizierten T-Helferzellen, die lange genug überlebten, um in den Zustand einer ruhenden Gedächtniszelle überzugehen (Finzi, 1998). CD4 positive Gedächtniszellen, besonders solche, die sich gerade von der aktivierten naiven

Helferzelle in eine Gedächtniszellen umwandeln, können aber auch direkt mit HIV infiziert werden. Dagegen weisen ruhende naive CD4 positive T-Zellen nur eine geringe Empfänglichkeit für eine HIV-Infektion auf (Mitsuyasu, 1999). Nicht-infizierte wie infizierte CD4 positive Gedächtniszellen rezirkulieren nach allgemeiner Annahme zwischen Lymphknoten, lymphatischem System und dem Blut (Chun et al., 1997; Mitsuyasu, 1999; Kirschner et al.; 2000). Um dieses komplexe System besser verständlich zu machen, wird hier ein zusammenfassendes Modell von Kirschner et al. (2000) zur Verdeutlichung der Dynamik und der Zirkulationsmuster CD4 positiver infizierter Lymphozyten während der HIV-1 Infektion gezeigt (Abb. 6). Berücksichtigt werden hier neben latent infizierten Gedächtniszellen auch die zuvor diskutierten Lymphozyten mit nicht-integrierter DNA (siehe 4.4.2.) und aktivierte, produktiv infizierte Zellen (siehe 4.4.1.).

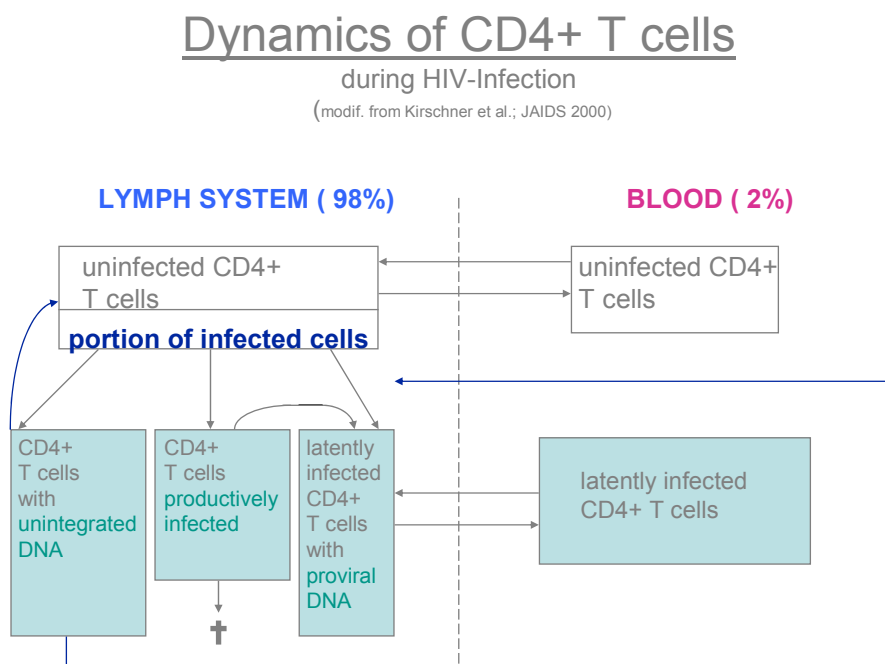


Abb. 6 Dynamik der CD4 positiven T Zellen während der HIV-Infektion; CD4 positive Zellen mit proviraler DNA (latent infiziert) rezirkulieren zwischen dem lymphatischen System und dem Blutkompartiment, CD4 positive T-Zellen mit unintegrierter DNA gelangen ebenso ins Blut, bei der Rückkehr in das lymphatische System unterliegt diese Population aber einer erhöhten Apoptoserate. Die Mehrheit der produktiv-infizierten CD4 positiven T-Zellen geht noch im lymphatischen Gewebe zugrunde.

Zu beachten ist, dass in den Zirkulationsmustern dieser Zellen Unterschiede existieren, je nachdem ob mit ART therapiert wird oder nicht. So wurde nachgewiesen, dass die Zahl der Gedächtniszellen einige Monate nach Therapiebeginn im Blut ansteigt, hervorgerufen durch eine Umverteilung der Lymphozyten von den Lymphknoten ins Blut (Pakker et al., 1998; Bucy et al., 1999; Zhang et al., 1998; Kirschner et

al., 2000). Dadurch stellt sich wieder das normale Verteilungsverhältnis der Lymphozyten von 98 % (*vorher 99 %*) im lymphatischen Gewebe und 2 % (*vorher 1 %*) im Blut ein.

Das Reservoir der latent-infizierten T-Helferzellen etabliert sich wahrscheinlich bereits nach der primären HIV-Infektion (Chun et al., 1998). Die Größe dieser Zellpopulation ist bei Patienten während der asymptomatischen Phase, also zwischen der Primärinfektion und der Entwicklung von AIDS, mit weniger als 0,05% im Bezug auf alle ruhenden CD4 positiven T-Zellen sehr klein. Diese Zahl gilt sowohl für die Blutzirkulation als auch für den Lymphknoten. Zudem besteht kein Zusammenhang zwischen dem Anteil dieser Lymphozytenfraktion und der Viruslast, der CD4 positiven Zellzahl oder der verabreichten Therapie. Innerhalb dieser Fraktion existiert zudem noch ein großer Anteil an Zellen, die defekte provirale DNA beherbergen (Chun et al., 1997).

Wie schon in 4.4.2. erwähnt, zeigt sich in Patienten mit AIDS ein Anstieg der Zellfraktion mit integrierter DNA im Vergleich zu extrachromosomaler DNA (Bukrinsky et al., 1991).

Das Reservoir der latent-infizierten CD4 positiven Gedächtniszellen zeichnet sich aufgrund der bereits integrierten HIV-DNA durch eine große Stabilität aus. Die Halbwertszeit liegt im Bereich von Monaten oder sogar Jahren (Finzi et al., 1999; Di Mascio et al., 2003; Siliciano et al., 2003). Die Rate des Verschwindens hängt wahrscheinlich vom Niveau der Virusreplikation und der Proliferationsfähigkeit infizierter Zellen ab, die für eine kontinuierliche Erneuerung dieses Reservoirs sorgen (Furtado et al., 1999; Ramratnam et al., 2000; Persaud et al., 2003). In einer neueren Veröffentlichung (bei Patienten mit Avirämie über ca. 9 Jahre) fand man zudem Hinweise auf eine Kreuzinfektion zwischen dem Kompartiment der aktivierten und der ruhenden CD4 positiven T-Zellen. Die Autoren schlussfolgern, dass so das CD4 positive T Zell-Reservoir kontinuierlich wiederaufgefüllt und die Halbwertszeit der latent-infizierten CD4 positiven T-Zellen ständig verlängert wird (Chun et al. 2005).

Das HIV-Genom dieser Zellen (in Patienten mit kompletter Plasmasuppression) ist aufgrund der langen Lebenszeit archivarischer Natur und weist, wenn überhaupt, nur solche Resistenzmutationen auf, die von einer länger zurückliegenden Therapie oder ursprünglich vorliegenden Mutationen herrühren. Bei Patienten mit inkompletter Suppression finden sich allerdings gehäuft Nukleotidaustausche (Wong et al., 1997; Gunthardt et al., 1998; Furtado, 1999; Lambotte et al., 2004; Monie et al., 2005).

Latent-infizierte CD4 positive T-Lymphozyten sind also als ein wichtiges Reservoir von HIV identifiziert worden (Finzi und Siliciano, 1998; Chun and Fauci, 1999; Blankson et al., 2002; Monie et al.; 2005). Bei Änderung des Therapieschemas mit Wegfall des ursprünglichen Selektionsdrucks könnten diese Zellen nach entsprechender Reaktivierung die Virusproduktion wieder aufnehmen und die dominante HIV-Population stellen. Es existieren aber auch Untersuchungen, durchgeführt nach Unterbrechung von HAART, die zeigen, dass die neu auftretende Viruspopulation zum Teil genetisch different vom vorherrschenden HIV-Stamm in den Helferzellen im Blut ist. Dabei wurde festgestellt, dass die Größe des latenten HIV Reservoirs vor Therapieunterbrechung (in beiden Studien keine Plasmavirämie nachweisbar!) nicht ausreichend mit dem Ausmaß der nachfolgenden Plasmavirämie korrelierte. Unterschiede zwischen dem Genom des Plasmavirus und dem Genom des latenten Lymphozytenreservoirs könnten damit zusammenhängen, dass aufgrund einer unzureichenden Suppression der viralen Replikation durch die Chemotherapie die virale Aussaat von anderen infizierten Zellen bzw. von Gewebekompartimenten ausgeht, die zu einer Plasmavirämie nach einem Therapiestopp beitragen (Chun et al., 2000; Zhang et al., 2000; siehe 4.3). Daneben könnten auch chronisch-infizierte Makrophagen eine Rolle spielen (Aquaro et al., 2002).

Zusammengefasst:

Aufgrund des dargestellten Mengenverhältnisses an latent-infizierten Lymphozyten im Blut könnte ihre DNA durchaus vom PRT-System erfasst worden sein. Möglicherweise vor allem dann, wenn die HIV-Replikation durch effektive HAART deutlich gemindert ist, da dann diese Fraktion nicht von den unter 4.4.2 aufgeführten Zellen verdrängt werden konnte.

4.4.4. Naive CD4 positive T-Lymphozyten mit integrierter DNA

Neben den CD4 positiven Gedächtniszellen wurden auch immunologisch naive Helferzellen gefunden, die in geringem Maß provirale DNA beherbergen. Möglicherweise sind diese aus Lymphozyten, die phänotypisch ehemals Gedächtniszellen waren oder durch (in sehr seltenen Fällen) direkte Infektion hervorgegangen (Pierson et al., 2000). Ebenso ist eine direkte Infektion von Thymozyten möglich (Brooks, NatMed, 2001).

4.4.5. Monozyten

Neben den beschriebenen Lymphozyten können (in kleinerem Umfang) auch die Monozyten des Blutes, Vorläufer der Makrophagen, HIV-DNA enthalten.

In zirkulierenden Monozyten ist infektiöses Provirus sogar in Patienten unter effizienter HAART nachweisbar (Sonza et al., 2001; Zhu et al., 2002). In Patienten mit aktiver Virusreplikation aufgrund von Therapieversagen stieg die Anzahl der replikationsfähigen Monozyten (bzw. die aus ihnen gezüchtete Makrophagen-Zellkultur) von weniger als 10% auf ca. 50% an (Harrold et al., 2002). Es wird angenommen, dass die Zellen der Monozyten/Makrophagenlinie bald nach der Übertragung von HIV infiziert werden und ebenso wie latent-infizierte Zellen während allen Infektionsstadien als virales Reservoir vorhanden sind (Orenstein et al., 1997; Finzi und Siliciano, 1998). Diese Vermutung könnte auch die Beobachtung erklären, dass Sequenzanalysen Monozyten-assoziiierter DNA keine neuen Resistenzmutationen zeigten (Lambotte et al., 2000; Sonza et al., 2001). Monozyten befinden sich 36-104 Stunden im Blut, bevor sie schließlich ins Gewebe wandern und dort zu Makrophagen transformieren (Meuret und Hoffmann, 1973; van Furth, 1979). Man nimmt an, dass einmal ins Gewebe emigrierte Makrophagen diesen Ort nicht wieder verlassen (Begemann und Rastetter, 1993).

Die Zellzahl der Monozyten im Blut beträgt 90 - 600 / μ l (Herold et al., 2005). Aufgrund ihrer Größe kann diese Zellfraktion durchaus die HIV-DNA beherbergenden CD4 positiven T-Lymphozyten im Blut dominieren: Deren Größe hängt von der CD4-Zellzahl im Blut und dem Prozentsatz der infizierten Zellen ab. Bei gesunden Erwachsenen finden sich 435-1600 T4 Helferzellen pro μ l im Blut (Herold et al., 2005). Legt man die Zahlen von Bukrinsky et al. (1991) zugrunde, sind bei Patienten in der asymptomatischen Phase 0,07-0,4% bzw. bei der Entwicklung von AIDS bis zu 1 % der CD4 positiven T-Lymphozyten infiziert.

4.5. Interpretation der erhaltenen Daten in Bezug auf die patientenspezifischen Laborparameter Viruslast und CD4-Zellzahl

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich keine klare Korrelation zwischen den Resistenzmustern von DNA vs. RNA und der Höhe der jeweiligen Viruslast bzw. der Anzahl der CD4 positiven Zellen.

Zunächst war vermutet worden, dass bei hoher Viruslast die Resistenzergebnisse für DNA und RNA im PRT übereinstimmen müssten. Diese Vermutung basierte auf der

Annahme, dass sich aufgrund der hohen Replikationsrate und des damit verbundenen hohen Zell-Umsatzes neue Viruspopulationen rasch auch in der proviralen DNA infizierter Zellen widerspiegeln müssten. Bei niedriger Replikationsrate hingegen wurden eher Unterschiede erwartet. Erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die aus zwei Patientenproben (Viruslast 20.000 bzw. > 300.000) gewonnen wurden, wiesen in diese Richtung (Gehring, 2001).

In der vorliegenden Arbeit erwies sich diese Annahme bei Patient 24 als richtig. Bei einer niedrigen Viruslast von ca. 1.900 cp/ml zeigte die RNA Resistenzen, wohingegen das Resistenzprofil der DNA dem einer WT-Protease entspricht. Die hohe Zahl an CD4 positiven Zellen (927/ μ l bzw. 23%) bei diesem Patienten ist ein Indikator für einen guten Immunstatus. Bei zwei weiteren Patienten (Patient C und Patient 7141) zeigten sich allerdings ebenfalls Unterschiede im Resistenzprofil zwischen DNA und RNA, obwohl die Viruslast in beiden Fällen deutlich höher war (23.000 cp / ml bzw. 230.000 cp / ml).

Eine hohe Viruslast lässt also nicht generell auf eine Übereinstimmung von peripherer HIV-DNA und -RNA schließen.

Diese Feststellung deckt sich partiell mit einer neueren Studie von Chew et al. (2005). Dabei wurde zwar bei Patienten mit „intermediärer“ (10.000 cp / ml bis < 100.000 cp / ml) und „hoher“ (> 100.000 cp / ml) Viruslast eine insgesamt gute Korrelation zwischen dem Plasma- und PBMC-Kompartiment bezüglich der PI / RTI-Resistenz festgestellt, allerdings war die Resistenzrate im Plasma doch tendentiell höher als in PBMCs. Bei Patienten mit einer Viruslast von < 10.000 cp / ml („niedrige“ Viruslast) war die Anzahl der Proteasemutationen (auch der Primärmutationen) im Plasma generell höher als in PBMCs. In einer weiteren Studie, in der ein Vergleich zwischen der genotypischen Resistenz von HIV-PBMC-DNA UND HIV-Plasma-RNA vorgenommen wurde, fand sich in den diskordanten DNA-RNA-Paaren keinerlei Korrelation zu virologischen und immunologischen Parametern (Sarmati et al., 2005).

Die CD4-Zellzahl von Patient C in der vorliegenden Arbeit war mit 79 / ml äußerst niedrig, was für einen schlechten Immunstatus spricht und mit dem Befund der hohen Viruslast korreliert. Für Patient 7141 war die CD4-Zahl nicht verfügbar. Während bei Patient C sowohl die RNA als auch die DNA deutliche Resistenzen aufwies, die Resistenz in der RNA bei einigen PIs allerdings noch höher war, wurden für Patient 7141 relativ niedrige Resistenzfaktoren für DNA im Gegensatz zu überwiegend hohen Faktoren der RNA ermittelt. Bei Patient C, dessen HIV-Population u. a. unter

dem Selektionsdruck von Lopinavir und Ritonavir stand, könnte zum Zeitpunkt der Blutabnahme ein Wechsel zu einer in höherem Maß resistenten Population abgebildet worden sein: In der Genotypisierung wurden die zusätzlichen Mutationen I50I/V und I54I/V festgestellt, die auf unterschiedliche, gleichzeitig vorkommende Viruspopulationen hinweisen. Da der Wechsel zu einer neuen dominanten Viruspopulation möglicherweise gerade stattfand, war diese wahrscheinlich noch nicht in der zellulären HIV-DNA abgebildet.

Die Unterschiede zwischen DNA und RNA bei Patient 7141 sind so nicht zu erklären, zumal der Patient zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht unter dem Selektionsdruck eines PIs stand, eine Behandlung mit Nelfinavir lag 2 Jahre zurück. Hier gibt es Hinweise, dass für die DNA unterschiedliche Populationen existieren (Mutation L90M/L), die auch im PTR erfasst wurden.

Da die Patientenparameter „Viruslast“ und „CD4-Zahl“ offensichtlich für unsere Interpretation nicht ausreichen, sollen die Überlegungen im Folgenden auf die virale Dynamik, d.h. die „Geschichte“ der PBMC-DNA-Population erweitert werden:

4.6. Interpretation der Daten in Hinblick auf die virale Dynamik

4.6.1. Interpretation der Resistenz-Unterschiede bei 3 Patienten

Resistenz-Unterschiede wurden bei den Patienten C, 24 und 7141 festgestellt.

Die Daten von Patient C weisen möglicherweise auf einen Wechsel der dominierenden Plasmapopulation hin: In den zirkulierenden PBMCs dominiert noch frühere DNA, was auf die längere Lebenszeit der mononukleären Blutzellen im Vergleich zur kurzen Lebenszeit des Virus im Plasma (Halbwertszeit < 6 Stunden) zurückzuführen ist. Die PBMCs setzen sich möglicherweise sowohl aus infizierten Monozyten als auch aus infizierten CD4 positiven T-Lymphozyten mit überwiegend unintegrierter DNA zusammen. Aufgrund des einheitlichen DNA-Resistenzmusters überwiegt eine Population oder aber mehrere Populationen sind in ihren Resistenzmutationen identisch. Die in der RNA zusätzlich gefundenen Mutationen I50V und I54V (spezifisch für Amprenavir und Ritonavir) könnten „späte“ Mutationen der kurz vor der Untersuchung angewendeten PIs APV und RTV sein.

Bei Patient 7141 liegt wohl kein Wechsel der RNA-Population vor, da der Selektionsdruck eines individuellen PIs fehlt. Wie könnte man sich hier den höheren Resistenzgrad der RNA im Gegensatz zur DNA erklären? Die DNA-Population müsste aus

langlebigen Zellen stammen, deren HIV-Genom archivarischen Charakter hat. Dafür kommen Monozyten und latent-infizierte ruhende CD4 positive Gedächtniszellen in Frage, die einen früheren Infektionszeitpunkt und dessen eventuelle Therapie abbilden. Allerdings liegt bei diesem Patienten eine relativ hohe Replikationsaktivität (geschlossen aus der Viruslast von 23.000 cp/ml) vor. Ein Überwiegen der Gedächtniszellen im Blut ist deshalb unwahrscheinlich, weil die hohe Replikationsrate eher zu einem „Homing“ dieser Lymphozytensubpopulation führt (und im Blut vor allem erst kürzlich infizierte Lymphozyten mit unintegrierter DNA, deren Lebensdauer begrenzt ist, auftreten müssten). Am wahrscheinlichsten ist die überwiegende Erfassung von HIV-DNA aus Monozyten. Aufgrund der erwähnten Heterogenität der PR-Sequenz existieren aber wohl mehrere Subpopulationen, zusammengesetzt aus einer Zellart oder einer Mischung der oben erwähnten.

Im Fall des Patienten 24 stellt sich die Sachlage klarer dar. Hier könnte die HIV-DNA, die Wildtyp-Charakter hat, tatsächlich aus latent-infizierten CD4 positiven Gedächtniszellen stammen, da die Viruslast mit 1.900 cp/ml doch relativ gering ist und auch die hohe Helferzellzahl für eine eher niedrige Replikationsrate spricht. Da aber auch die HIV-DNA der Monozyten archivarischen Charakter hat, könnten diese Zellen ebenfalls maßgeblich zur erfassten DNA-Fraktion beigetragen haben.

4.6.2. Interpretation beim Vorliegen übereinstimmender Resistenzmuster in DNA und RNA

Eine Übereinstimmung der übrigen 9 Patienten im Resistenzmuster von DNA und RNA kann im Hinblick auf die oben dargestellten Theorien dahingehend gedeutet werden, dass einerseits der Großteil der im PRT erfassten HIV-DNA im Blut erst kürzlich gebildet wurde. Als mögliche Zellfraktion, die diese Vorgabe erfüllt, kommen hier CD4 positive T-Lymphozyten, die hauptsächlich unintegrierte DNA beherbergen, in Frage. Es könnte allerdings auch sein, dass sich die analysierte HIV-RNA während eines längeren Zeitraumes nicht verändert hat und somit genug Zeit vorhanden war, dass diese genetische Information in den latent-infizierten CD4 positiven Gedächtniszellen archiviert wurde.

4.7. Konsequenzen aus den vorgelegten Ergebnissen für eine phänotypische Resistenztestung

Die Diskrepanzen in der oben zusammengefassten Literatur lassen sich nach den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit zusammengefasst so erklären, dass die RNA-basierten Daten relativ eindeutig die aktuelle Situation wiedergeben, die DNA-basierten Daten aber davon abhängen, aus welcher Zellpopulation mit welchen historischen Ereignissen verknüpft die DNA stammt.

Um die tatsächliche aktuelle Resistenzsituation gegenüber antiretroviralen Substanzen diagnostisch bestimmen zu können, sollte HIV-RNA aus Plasma verwendet werden, auch wenn bei der Gewinnung sowohl die Zentrifugation des Vollblutes als auch der Schritt der Reversen Transkription durchgeführt werden muss, was aufwendiger ist und mit einer potentiell höheren Infektionsgefahr für das Laborpersonal verbunden ist als die Extraktion von HIV-DNA. Für die HIV-RNA als dem geeigneten Ausgangsmaterial für den PRT spricht auch die kurze Halbwertszeit des Virus von weniger als 6 Stunden. Nachteilig könnte sich dagegen bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten Resistenzbestimmung aus RNA der zusätzlich nötige Schritt der Reversen Transkription auswirken. Es ist nicht auszuschließen, dass die Primer für den RT-Schritt selektiv wirken. Zudem muss bei einer RNA-Präparation immer eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden.

Die Fraktion der PBMCs, aus der die HIV-DNA isoliert wurde, ist dagegen möglicherweise (sehr) heterogen zusammengesetzt (siehe oben). Diese Zellen können auch frühere Infektionsstadien repräsentieren (Verhofstede et al., 2004). Diese Tatsache kann man sich allerdings für spezielle Fragestellungen zunutze machen, zum Beispiel, um stille Mutationen aufzudecken. Solche Untersuchungen geben zwar keine Auskunft über Medikamente, die zum aktuellen Zeitpunkt unwirksam sind, können aber Informationen über antiretrovirale Substanzen liefern, die für die HIV-Therapie gemieden werden müssen. Da eine resistente Virusvariante unter Selektionsdruck innerhalb einiger Wochen zur dominanten Viruspopulation heranwachsen kann, ist es hilfreich, solche Minorpopulationen vor einer Veränderung der Therapiebedingungen aufzuspüren (Rusconi S. und Moroni M.; 2000; Noe et al., 2005).

Die in der vorliegenden phänotypischen Analyse erhobenen Daten aus RNA wurden durch den Vergleich mit dem Genotyp weitestgehend bestätigt (3.9). Die wenigen gefundenen Unterschiede zeigen möglicherweise den tatsächlichen Vorteil der phänotypischen gegenüber der genotypischen Methode auf.

4.8. Zusammenfassung

Das Auftreten von Resistenzen ist eines der Hauptprobleme der heute angewandten antiretroviralen Therapie. Resistenzen können diagnostisch mit dem sog. genotypischen oder dem phänotypischen Verfahren festgestellt werden. Die genotypische Diagnostik beruht auf der Nukleotid-Sequenzierung der viralen Target-Gene Reverse Transkriptase oder Protease, die relativ einfach zu bewerkstelligen ist. Ein phänotypischer Resistenztest und damit direkter Aktivitätstest der Enzyme RT und PR ist sehr viel präziser. Dies ist z.B. beim Vorliegen komplexer Resistenzmuster oder einem Mangel an genotypischer Information von resistenzrelevanten Mutationen bei einem neu verwendeten antiviralen Medikament von großer Bedeutung. Die zu testenden Enzyme werden entweder aus DNA, isoliert aus PBMCs aus Patientenvollblut oder Plasma-RNA rekombinant hergestellt.

Vor kurzem wurde nun die Frage erhoben, ob die diagnostisch gemessenen Werte Unterschiede aufweisen, je nachdem ob DNA oder RNA als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit das phänotypische Resistenzverhalten der HIV-Protease von 12 Patienten gegenüber 5 verschiedenen Proteaseinhibitoren untersucht. Aus jedem der Patienten wurde ein „Protease-Paar“ sowohl aus HIV-DNA als auch HIV-RNA (via cDNA) rekombinant produziert. Die Patienten wiesen eine unterschiedliche Höhe der Viruslast auf, sie lag zwischen 1.900 cp/ml und 230.000 cp/ml, und hatten unterschiedlich hohe CD4-Zellzahlen.

Mit dieser Untersuchung sollte also erstens die Frage beantwortet werden, ob zu einem gegebenen Zeitpunkt Abweichungen im Resistenzprofil zwischen den beiden Formen genetischer Information von HIV im Körper vorliegen können. Im positiven Fall sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Virusvermehrung/Virusdynamik und der Immunstatus des betroffenen Patienten, ausgedrückt durch die Laborparameter Viruslast und CD4-Zellzahl, darauf haben.

Zweitens sollte dasjenige Probenmaterial gefunden werden, welches für den phänotypischen Resistenztest das optimale Resultat ergibt: entweder HIV-DNA aus PBMCs im Vollblut oder HIV-RNA aus Blutplasma.

Der hier verwendete phänotypische Resistenztest (PRT) basiert auf der direkten Messung der HIV-Proteaseaktivität, die durch rekombinante Expression der gesamten Population von HIV-Protease eines Patienten hergestellt wurde. Für die vorliegende Arbeit wurde parallel sowohl HIV-DNA aus PBMCs im Vollblut als auch cDNA

aus viraler RNA im Blutplasma des Patienten als Ausgangsmaterial für die nested PCR verwendet. Nach erfolgter Expression des Enzyms in *E. coli* und effektiver Einzschritt-Aufreinigung wurde die Proteaseaktivität mit einem neuen und schnellen phänotypischen Testsystem mittels eines Fluoreszenzsubstrats in Ab- und Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren gemessen. Durch den Vergleich mit Wildtyp-Werten konnten die entsprechenden Resistenzfaktoren berechnet werden.

Ergebnis: Von den 12 untersuchten Patienten zeigten sich in 3 „DNA/RNA-Paaren“ signifikante Unterschiede in mindestens einem Proteaseinhibitor, während bei 9 Patienten übereinstimmende Resistenzmuster gefunden wurden.

Schlussfolgernd wird festgestellt, dass die Verwendung von entweder DNA oder RNA als Ausgangssubstanz für den benutzten Resistenztest unterschiedliche Ergebnisse im Resistenzmuster erbringen kann, dies aber nicht notwendigerweise der Fall ist. Zwischen dem Auftreten bzw. Fehlen von unterschiedlichen Resistenzmustern und den virologischen und immunologischen Parametern Viruslast und Anzahl der CD4 positiven Zellen konnte keine klare Korrelation festgestellt werden.

Ein Auftreten von Differenzen zwischen den Resistenzmustern von DNA und RNA kann die Folge eines Populationswechsels der HIV-RNA sein, die im Gegensatz zur archivarischen Natur der meist integrierten DNA aus ruhenden CD4 positiven T-Gedächtniszellen oder Monozyten erst kürzlich von aktiv infizierten Zellen produziert wurde. Ein Fehlen von Unterschieden kann bedeuten, dass die Hauptfraktion der DNA entweder erst kürzlich generiert wurde (eventuelles Vorliegen großer Mengen an nicht-integrierter DNA; siehe 4.4.2) oder die RNA sich nicht verändert hat.

Für die diagnostische Anwendung des PRT haben diese Ergebnisse folgende Konsequenzen: um die aktuelle Resistenzsituation abzubilden, ist virale RNA aus dem Blutplasma das bevorzugte Ausgangsmaterial. Um dagegen stille Mutationen aufzudecken, die z. B. für zukünftige Therapien oder eine adäquate Postexpositionsprophylaxe von Bedeutung sind, sollte virale DNA, stammend aus PBMCs des Vollblutes, verwendet werden.

5. Literaturverzeichnis

5.1. Publikationen

Aquaro S, Caliò R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF (2002). Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral Res* 55: 209-225

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

Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Manheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC (2000). A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* **14**: F83-F93

Begemann H und Rastetter J (1993). *Klinische Hämatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York

Blankson JN, Peraud D, Siliciano RF (2002). The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **53**: 557-593

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254

Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA (2001). Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat Med* **7**: 459-464

Bröker M (1986). Vectors for regulated high-level expression of proteins fused to truncated forms of *Escherichia coli* β -galactosidase. *Gene Anal Techn* **3**: 53-57

Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu RT, Kilby JM (1999). Initial increase in blood CD4 (+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* **103**: 1391-1398

Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* **254**: 423-427

Carr A, Miller J, Law M, Cooper DA (2000). A syndrome of lipodatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *AIDS* **14**: F25-32

Chew CB, Potter SJ, Wang B, Wang YM, Shaw CO, Dwyer DE, Saksena NK (2005). Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J Clin Virol* **33(3)**: 206-216

Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen Y, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**: 183-188

Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L; Fauci AS (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 8869-8873

Chun TW, Fauci AS (1999). Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 10958-10961

Chun TW, Davey RT, Ostrowski M, Shawn JJ, Engel D, Mullins JI, Fauci AS (2000). Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med* **6**: 757-761

Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, O'Shea MA, Hallahan CW, Daucher M, Ward DJ, Moir S, Mullins JI, Kovacs C, Fauci AS (2005). HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest* **115**: 3250-3255

Cignolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, Gi Giambenedetto S, Cauda R, De Luca A (2002). Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS* **16**: 369-379

Coffin JM (1995). HIV population dynamics in vivo: implication for genetic variation pathogenesis and therapy. *Science* **267**:483-489

Coffin JM, Hughes SH, Varimus HE (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA

Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, Nadler J, Verbiest W, Hertogs K, Ames M, Rinehart AR, Graham NM (2002). A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* **16**: 579-588

Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Titus D, Yang T, Teppler H, Squires KE, Deutsch PJ, Emini EA (1995). In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**: 569-571

Cornelissen M, Kampinga G, Zorgdrager F, Goudsmit J and UNAIDS network for HIV Isolation and Characterization (1996). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. *J Virol* **70**: 8209-8212

Cornelissen M, van den Burg R, Zorgdrager F, Lukashov V, Goudsmit J (1997). Pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for

naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol* **71**: 6348-6358

D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, Fischl MA, Sommadossi JP, Liou SH, Timponone J, Myers M, Basgoz N, Niu M, Hirsch MS (1996). Nevirapine zidovudine and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Int Med* **124**: 1019-1030

Di Mascio M, Dornadula G, Zhang H, Sullivan J, Xu Y, Kulkosky J, Pomerantz RJ, Perelson AS (2003). In a subset of subjects on highly active antiretroviral therapy, human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma decays from 50 to <5 copies per milliliter, with a half-life of 6 months. *J Virol* **77**: 2271-2275

Dietrich U, Raudonat I, Wolf E, Jäger H, Husak R, Orfanos CE, Knickmann M, Knechten H, von Briesen H, Ruppach H, Immelmann A (1999). Indication for increasing prevalence of resistance mutations for protease inhibitors in therapy-naive HIV-1-positive German patients. *AIDS* **13**: 2304-2305

Debiaggi M, Bruno R, Sacchi P, Achilli G, Romero E, Filice G (2002). Distinct mutational drug resistance profiles of HIV-1 RNA in plasma and culture isolates of patients receiving antiretroviral therapy. *Intervirology* **45**: 52-55

Del Sal G, Manfioletti G and Schneider C (1988). A one-tube DNA miniprep suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research* **16**, 9878

Denner J, L'age-Stehr J, L'age M (2002). „Pathogenese von AIDS“ aus AIDS und die Vorstadien“; Springer LoseblattSysteme; Ausgabe April 2002

Devereux HL, Loveday C, Youle M, Sabin CA, Burke A, Johnson M (2000). Substantial correlation between HIV type 1 drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment-experienced patients. *AIDS Res Hum Retrovir* **16**: 1025-1030

Diaz RS, Sabino EC, Mayes A, Mosley JW, Busch MP and The Transfusion Safety Study Group (1995). Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. *J Virol* **69**: 3273-3281

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale W (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145

Drake JW (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 4171-4175

Dunn DT, Green H, Loveday C, Rinehart A, Pillay D, Fisher M, McCormack S, Babiker AG, Darbyshire JH (2005). A randomized controlled trial of the value of phenotypic testing in addition to genotypic testing for HIV drug resistance: evaluation of resistance assays (ERA) trial investigators. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**: 553-559

Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CAB, Schapiro JM, Dellamonica P (1999). Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* **353**: 2195-2199

Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kucherer C (2001). Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**: 266-273

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**: 359-362

Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**: 1295-1300

Finzi D, Siliciano RF (1998). Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**: 665-671

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* **5**: 512-517

Flexner C (2000). Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: pharmacologic rationale benefits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 649-74

Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, Perelson AS, Wolinsky SM (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *NEJM* **340**: 1614-1622

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovich M, Shearer M, Kaplan M, Haynes BR, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. *Science* **224**: 500-503

Garcia-Lerma JG, Heneine W (2001). Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing. *J Clin Virol* **21**: 197-212

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

Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourneur F, Aaron L, Goujard C, Salmon D, Leruez-Ville M, Rouzioux C, Chaix ML (2004). Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HI-infected men. *AIDS* **18**:447-457

Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV, Richman DD (1998). Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* **72**: 2422-2428

Haase et al. (1997). Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* **274**: 985-989

Harrold SM, Wang G, McMahon DK, Riddler SA; Mellors JW, Becker JT, Caldararo R, Reinhart TA, Achim CL, Wiley CA (2002). Recovery of replication-competent HIV type 1-infected circulating monocytes from individuals receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**: 427-434

Haubrich RH, Kemper CA, Hellmann NS, Keiser PH, Witt MD, Tilles JG, Forthal DN, Leedom J, Leibowitz M, McCutchan JA, Richman DD (2005). A randomized, prospective study of phenotype susceptibility testing versus standard of care to manage antiretroviral therapy: CCTG 575. *AIDS* **19**: 295-302

Hellerstein MC, McCune JM (1997). T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity* **7**: 583-589

Herold G und Mitarbeiter (2005). Innere Medizin. Selbstverlag; August-Haas-Str. 43, 50737 Köln

Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Closet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richman DD (2000). Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* **283**: 2417-2426

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**: 123-126

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

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

Hoffmann D (2002). Ein neuartiges enzymatisches Auswerteverfahren für die in vitro Detektion phänotypischer HIV-1 Proteaseresistenz. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Hoffmann D, Buchberger B, Nemetz C (2005). In vitro synthesis of enzymatically active HIV-1 protease for rapid phenotypic resistance profiling. *J Clin Virol* **32**: 294-299

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Joly V and Yeni P (2000). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Ann Med Interne (Paris)* **151**: 260-267

Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R (1994). The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol* **68**: 6782-6786

Kaye S, Comber E, Tenant-Flowers M, Loveday C (1995). The appearance of drug resistance-associated point mutations in HIV type 1 plasma RNA precedes their appearance in proviral DNA. *AIDS Res Hum Retrovir* **11**: 1221-1225

Kirschner D, Webb GF, Cloyd M (2000). Model of HIV-1 disease progression based on virus-induced lymph node homing and homing-induced apoptosis of CD4+ lymphocytes. *JAIDS* **24**: 352-362

Koch N, Yahi N, Ariasi F, Fantini J, Tamalet C (1999). Comparison of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease mutations in HIV-1 genomes detected in plasma and in peripheral blood mononuclear cells from patients receiving combination drug therapy. *J Clin Microbiol* **37**: 1595-1597

Kohl NE, Emini E, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnik EM, Sigal IS (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 4686-4690

Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790

Kotler M, Arad G, Hughes SH (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-protease fusion proteins are enzymatically active. *J Virol* **66**: 6781-6783

Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman D, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR (1996). Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* **2**: 753-759

Kroodsma KL, Kozal MJ, Hamed KA, Winters MA, Merigan TC (1994). Detection of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pol gene: differences in semen and blood HIV-1 RNA and proviral DNA. *J Infect Dis* **170**: 1292-1295

Lambotte O, Taoufik Y, de Goër MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF (2000). Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *JAIDS* **23**: 114-119

Lambotte O, Chaix ML, Gasnault J, Goujard C, Lebras P, Delfraissy JF, Taoufik Y (2005). Persistence of replication-competent HIV in the central nervous system despite long-term effective highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **19**: 217-218

Lavalle C, Aguilar JC, Pena P, Estrada-Aguilar JL, Avina-Zubieta JA, Madrazo M (2000). Reduction in hospitalization costs, morbidity, disability, and mortality in patients with AIDS treated with protease inhibitors. *Arch Med Res* **31**: 515-519

Lee CGL, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, Pastan I, Dey S (1998). HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry* **37**: 3594-3601

Levy, JA (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* **57**: 183-289

Lindhofer H, von der Helm K, Nitschko H (1995). In vivo processing of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 (HIV) in acutely infected, cultured human T-lymphocytes. *Virology* **214**: 624-627

Mack M, et al (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Med.* **6**: 769-775

Mansky LM, Temin HM (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol* **69**: 5087-5094

Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Aquila RT (1999). Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**: 3744-52

Matayoshi ED, Wang G, Kraft G and Erickson J. (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* **24**: 954-958

Meuret G, Hoffmann G (1973). Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br J Haematol* **24**: 275-285

Miller V (2001). Resistance to Protease Inhibitors. *JAIDS* **26**: S34-S50

Mitsuyasu Ronald (1999). HIV protease inhibitors: immunological insights. *AIDS* **13**(suppl 1): S19-S27

Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R (1996). Medizinische Mikrobiologie. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden.

Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio Monforte A, Knysz B, Dietrich M, Phillips AN, Ludgren JD; EuroSIDA study group (2003). Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* **362**: 22-29

Monie D, Simmons RP, Nettles RE, Kieffer TL, Zhou Y, Zhang H, Karmon S, Ingersoll R, Chadwick K, Zhang H, Margolick JB, Quinn TC, Ray SC, Wind-Rotolo M, Miller M, Persaud D, Siliciano RF (2005). A novel assay allows genotyping of the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in the resting CD4+ T cells of viremic patients. *J Virol* **79**: 5185-5202

Morrison JF (1969). Kinetics of the reversible inhibition of enzyme catalysed reactions of thight-binding inhibitors. *Biochem Biophys Acta* **185**: 269-285

Moyle GJ, Back D (2001). Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Med* **2**: 105-13

Noe A, Plum J, Verhofstede C (2005). The latent HIV-1 reservoir in patients undergoing HAART: an archive of pre-HAART drug resistance. *J Antimicrob Chemother* **55**: 410-412

Nolan D, John M, Mallal S (2001). Antiretroviral therapy and the lipodystrophy syndrome, part 2: concepts in aetiopathogenesis. *Antivir Ther* **6**: 145-160

Ochoa dE, Arnedo M, Xercavins Mj, Martinez E, Roson B, Ribera E, Domingo P, Gonzalez A, Riera M, Llibre JM, Gatell JM, Dalmau D (2005). Genotypic and phenotypic resistance patterns at virological failure in a simplification trial with nevirapine, efavirenz or abacavir *AIDS* **19**: 1385-1391

Oette M, Kaiser R, Daumer M, Akbari D, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Stechel J, Rieke A, Mauss S, Schmaloer D, Gobels K, Vogt C, Wettstein M, Haussinger D (2004). Primary drug-resistance in HIV-positive patients on initiation of first-line anti-retroviral therapy in Germany. *Eur J Med Res* **9**: 273-278

Orenstein JM, Meltzer MS, Wahl SM (1997). Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections (1997). *Science* **276**: 1857-1861

Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT (1998). Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* **4**: 208-214

Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Achman DJ, Holmberg SD and the HIV outpatient study investigators (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced Human Immunodeficiency Virus infection. *The New England Journal of Medicine* **338**: 853-860

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**: 355-358

Peng C, Ho BK, Chang TW, Chang NT (1989). Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol* **63**: 2550-2556

Perelson AS, *et al* (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**: 1582-1586

Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K; Markowitz M, Ho DD (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**: 188-191

Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, Siliciano RF (2003). Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J Virol* **77**: 1659-1665

Phylip LH, Mills JS, Parten BF, Dunn BM, Kay J (1992). Intrinsic activity of precursor forms of HIV-1 protease. *FEBS Lett* **314**: 449-454

Pierson T, Hoffman TL, Blankson J, *et al* (2000). Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**: 7824-7833

Piliero PJ (2002). Atazanavir: a novel HIV-1 protease inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* **11**: 1295-301

Piliero PJ (2004). Atazanavir: A novel once-daily protease inhibitor. *Drugs Today (Barc)* **40**: 901-912

Pomerantz RJ (2002). Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clin Infect Dis* **34**: 91-97

Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD (2000). The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* **6**: 82-85

Richman DD (2001). HIV chemotherapy. *Nature insight* **410**: 995-1001

Richman DD (2004). Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs. *J Antimicrob Chemother* **53**: 555-557

Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH (1995). Recombination in HIV-1 [letter]. *Nature* **374**: 124-126

Rusconi S, Moroni M (2000). Clinical impact of antiretroviral resistance testing: current problems and future directions. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**: 425-427

Sanchez G, Xu X, Chermann JC, *et al.* (1997). Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**: 2233-2240

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467

Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989). Molecular Cloning, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Sarmati L, Nicastrì E, Uccella I, d'Ettore G, Parisi SG, Palmisano L, Galluzzo C, Concia E, Vullo V, Vella S, Andreoni M (2003). Drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected patients for whom highly active antiretroviral therapy is failing. *J Clin Microbiol* **41**: 1760-1762

Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA (2005). Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* **41**: 1316-1323

Schägger H und von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 1000 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379

Schapiro JM, Winters MA, Vierra M, Jacobsen H, Mous J, Merigan TC (1996). Resistance mutations in patients receiving Saquinavir: simultaneous appearance in lymph nodes, peripheral blood mononuclear cells (PBM) and plasma [abstract 28]. Presented at Fifth Workshop on HIV Drug Resistance, Whistler, Canada, 1996

Schrager LK, D'Souza MP (1998). Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral therapy. *JAMA* **280**: 67-71

Seelmeier S, Schmidt H, Turk V, von der Helm K (1988). Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6612-6616

Shafer RW, Schapiro JM (2005). Drug resistance and antiretroviral drug development. *J Antimicrob Chemother* **55**: 817-820

Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM, Kati W, Stewart K, Lal R, Hsu A, Betebenner D, Korneyeva M, Vasavanonda S, McDonald E, Saldivar A, Wideburg N, Chen X, Niu P, Park C, Jayanti V, Grabowski B, Granneman GR, Sun E, Japour AJ, Leonard JM, Plattner JJ, Norbeck DW (1998). ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3218-3224

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ cells. *Nat Med* **9**: 727-728

Sonza S, Mutimer HP, Oelrichs R, Jardine D, Harvey K, Dunne A, Purcell DF, Birch C, Crowe SM (2001). Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **15**: 17-22

Spina CA, Guatelli JC, Richman DD (1995). Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *J Virol* **69**:2977-2988

Tomaselli AG, Heinrikson RL (2000). *Biochemica et Biophysica Acta* **1477**: 189-214

Toh H, Kikuno R, Hayashida H, Miyata T, Kugimiya W, Inouye S, Yuki S, Saigo K (1985). Close structural resemblance between putative polymerase of a Drosophila transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukaemia virus. *EMBO J* **4**:1267-1272

Van Furth (1970). Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Semin Haematol* **7**: 125-141

Van Heeswijk RP, Veldkamp A, Mulder JW, Meenhorst PL, Lange JM, Beijnen JH, Hoetelmans RM (2001). Combination of protease inhibitors for the treatment of HIV-

1-infected patients: a review of pharmacokinetics and clinical experience. *Antivir Ther* **6**:201-29

Verhofstede C, Noe A, Demecheleer E, De Cabooter N, Van Wanzele F, Van der Gucht B, Vogelaers D, Plum J (2004). Drug-resistant variants that evolve during non-suppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **35**: 473-483

Vittinghoff E, Scheer S, O'Malley P, Colfax G, Holmberg SD, et al. (1999). Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. *J Infect Dis.* **179**: 717-20

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

Von der Helm K, Seelmeir S, Kisselev A, Nitschko H (1994). Identification, purification and cell culture assays for retroviral proteases. *Methods Enzymol* **241**: 89-104

Von der Helm K (1996). Retroviral proteases: structure function and inhibition from a nonanticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol Chem* **377**: 765-774

Wang L, Robb CW, Cloyd MW (1997). HIV induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. *Virology* **228**: 141-150

Wang L, Chen JJ, Gelman BB, Konig R, Cloyd MW (1999): A novel mechanism of CD4 lymphocyte depletion involves effects of HIV on resting lymphocytes: induction of lymph node homing and apoptosis upon secondary signalling through homing receptors. *J Immunol* **162**: 268-276

Weber IT, Miller M, Jaskolski M, Leis J, Skalka AM, Wlodawer A (1989). Molecular modelling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* **243**:928-931

Wegner SA, Wallace MR, Aronson NE, Tasker SA, Blazes DL, Tamminga C, Fraser S, Dolan MJ, Stephan KT, Michael NL, Jagodzinski LL, Vahey MT, Gilcrest JL, Tracy L, Milazzo MJ, Murphy DJ, McKenna P, Hertogs K, Rinehart A, Larder B, Birx DL (2004). Long-term efficacy of routine access to antiretroviral-resistance testing in HIV type 1-infected patients: results of the clinical efficacy of resistance testing trial: *Clin Infect Dis* **38**: 723-730

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**: 117-122

Wensing,A.M.; van de Vijver,D.A.; Angarano,G.; Asjo,B.; Balotta,C.; Boeri,E.; Camacho,R.; Chaix,M.L.; Costagliola,D.; De Luca,A.; Derdelinckx,I.; Grossman,Z.; Hamouda,O.; Hatzakis,A.; Hemmer,R.; Hoepelman,A.; Horban,A.; Korn,K.; Kucherer,C.; Leitner,T.; Loveday,C.; MacRae,E.; Maljkovic,I.; de Mendoza,C.; Meyer,L.; Nielsen,C.; Op de Coul,E.L.; Ormaasen,V.; Paraskevis,D.; Perrin,L.; Puchhammer-Stockl,E.; Ruiz,L.; Salminen,M.; Schmit,J.C.; Schneider,F.; Schuurman,R.; Soriano,V.; Stanczak,G.; Stanojevic,M.; Vandamme,A.M.; Van Laethem,K.; Violin,M.; Wilbe,K.; Yerly,S.; Zazzi,M.; Boucher,C.A (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management *J Infect Dis* **192**:958-966

Witvrouw M, Pannecouque C, Van Laethem K, Desmyer J, De Clercq E, Vandamme AM (1999). Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 AND SIV. *AIDS* **13**: 1477-1483

Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**: 1291-1300

Young B and Kuritzkes DR (1999). Viral kinetics: implications for treatment. *AIDS* **13**: S11-S17

Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* **61**: 213-222

Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Boies L, Chen Z, Jenkins M, Mills R, McDade H, Goodwin C, Schuwirth CM, Danner SA, Haase AT (1998). Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1154-1159

Zhang L, Chung C, Hu BS, He T, Guo Y, Kim AJ, Skulsky E, Jin X, Hurley A, Ramratnam B, Markowitz M, Ho DD (2000). Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* **106**: 839-845

Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF (2005). Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells. *J Virol* **79**: 2199-2210

Zybarth G und Carter C (1995). Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing. *J Virol* **69**:3878-3884

5.2. Webseiten

Webseite 1:

http://www.unaids.org/epi/2005/doc/EPIupdate2005_html_en/Epi05_13_en.htm#a

Webseite 2:

http://www.rki.de/cln_006/nn_334076/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Epidemiologie/Daten_und_Berichte/EckdatenDeutschland,templateId=raw,property=publication/File.pdf/EckdatenDeutschland

Webseite 3:

http://www.rki.de/cln_011/nn_334606/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Therapie/Leitlinien/D_A_antiretroviral_06_05.html

Anhang

Anhang 1:

Mit HIV infizierbare humane Zellen

(nach Levy, 1993) aus „AIDS und die Vorstadien“, Springer Loseblattsysteme, 2002

Zellen des hämatopoetischen Systems	Zellen des Zentralnervensystems	Zellen in der Haut	Zellen im Gastrointestinaltrakt	Andere Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • T-Lymphozyten • B-Lymphozyten • Makrophagen • Natürliche Killer-Zellen • Megakaryozyten • Dendritische Zellen • Promyelozyten • Thymusepithelzellen • Follikuläre dendritische Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelzellen • Astrozyten • Mikroglia (Makrophagen) • Oligodendrozyten • Plexus-choroideuszellen • Ganglienzellen • Neurone 	<ul style="list-style-type: none"> • Langerhans-Zellen • Fibroblasten 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonkarzinomzellen • Becherzellen • Enterochromaffine Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Myokardzellen • Nierentubuluszellen • Synoviazellen • Lebersinusoidzellen • Leberkarzinomzellen • Kupffer-Sternzellen • Lungenfibroblasten • Nebennierenzellen • Retinazellen • Zervixzellen • Prostatazellen • Osteosarkomzellen • Rhabdomyosarkomzellen • Plazentare Trophoblastzellen

Anhang 2:

Patient 4 mit Resistenzmutationen sowie weitere Laborparameter und Therapie (Blut vom 26.09.2000)

Viruslast: 1.200.000 cp/ml (Sept/2000)

CD4 positive T-Zellen: 25/ μ l (Sept/2000)

ART: von 04/2000 bis 11/2000: d4T, ddl, RTV und SQV

DNA: L10I, M36I, L63P, V77I, L90M

RNA: M36I/M, L63P, V77I, L90M

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad.	auffüllen bis
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ART	antiretrovirale Therapie
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation/bestimmte Oberflächenantigene auf der Zelle
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
ca.	circa
CMV	Cytomegalievirus
cp/ml	HIV-RNA-Kopien pro Milliliter
Da	Dalton
DABCYL	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
EDANS	5-[(Aminoethyl)amino]naphtalen-1-sulfonsäure
g	Gramm
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	humanes Immundefizienzvirus
h	Stunde
IC50	50 %-ige Hemmkonzentration
kD	Kilo-Dalton
Ki/Ki	Inhibitionskonstante
konz.	konzentriert
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol/Liter
l	Liter
mA	Milli-Ampere
ms	Milli-Sekunden
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol/Liter

n.d.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NNRTI	nicht nukleosidartige RT-Inhibitoren
NRTI	nukleosidartige RT-Inhibitoren/ Nukleosid-Analoga
OD	optische Dichte
P/Pat.	Patient
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBMCs	“peripheral blood mononuclear cells”/ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Proteaseinhibitor
PR	Protease des HI-Virus
PRT	phänotypischer Resistenztest
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
UPM	Umdrehungen pro Minute
RPC	reversed phase chromatography
RT	Reverse Transkriptase des HI-Virus
RKI	Robert-Koch-Institut
sec.	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
Tab.	Tabelle
U	“unit”/ enzymatische Einheit
UNAIDS	United Nations AIDS
V	Volt
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heesemann danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ und Herrn Prof. Dr. Koszinowski für die Aufnahme am Lehrstuhl für Virologie des Max-von-Pettenkofer Institutes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. von der Helm für die Bereitstellung des interessanten Themas, sein kontinuierliches Mitwirken und Interesse am Fortgang dieser Arbeit und das engagierte Korrekturlesen. Herr Prof. von der Helm hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und gerade die Diskussion theoretischer Hintergründe war für mich eine große Hilfe.

Bei meinem Mitbetreuer Dr. Hans Nitschko möchte ich mich besonders für seinen großen Einsatz bei der Lösung technischer Probleme bedanken. Wichtig waren mir auch seine Diskussionsbereitschaft und seine Fähigkeit, mich zum wissenschaftlichen Denken anzuregen. Ich danke ihm auch, dass er sich an den Korrekturarbeiten beteiligt hat.

Frau Heike Gehringer und Frau Sigrid Seelmeir danke ich für die Einarbeitung in die praktischen Grundlagen dieser Arbeit, Herrn Dr. Jürgen Blusch für ein offenes Ohr bei allen labortechnischen und molekularbiologischen Fragen. Herrn Dieter Hoffmann, der zur gleichen Zeit in unserer Arbeitsgruppe an seiner Doktorarbeit tätig war, möchte ich einerseits für die Einarbeitung in die von ihm entwickelte Methodik der enzymkinetischen Fluoreszenzmessung danken und andererseits für das gute Arbeitsklima und seine Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit.

Ohne die Zusammenarbeit mit dem Team der virologischen Diagnostik des Max-von-Pettenkofer Institutes hätten bestimmte praktische Teile dieser Arbeit nicht entstehen können. Deshalb danke ich besonders Herrn PD Dr. Eberle für die Mithilfe bei der Auswahl geeigneter Patienten, der Bereitstellung der dazugehörigen Patientenproben, der Ermittlung relevanter patientenspezifischer Daten und der Erstellung genotypischer Resistenzprofile. Frau Rita Scherbauer danke ich für die Durchführung der reversen Transkription und der nested PCR aus diversen Patientenproben.

Bei Herrn Prof. Bogner und Herrn Prof. Göbel von der HIV-Ambulanz der Medizinischen Poliklinik der LMU München möchte ich mich für die Bereitschaft zur Bereitstellung von Patientenproben und das Interesse an den Ergebnissen dieser Arbeit bedanken.

Am Ende möchte ich mich bei meinem Mann Alexander für die großartige Unterstützung, Ermutigung und seine Geduld bedanken!

Lebenslauf

Name Ulrike Heid, geb. Strommer

Geburtsdatum 19.02.1970

Geburtsort Schongau

Staatsangehörigkeit Deutsch

Anschrift Leipartstr. 20

81369 München

Eltern Alois Strommer

Sophia Strommer

Schulbildung

1976 - 1980 Grundschule Altstadt

1980 - 1982 Gymnasium Schongau

1982 - 1986 Realschule Schongau; Mittlere Reife

1993 - 1996 Städtisches Münchenkolleg; Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1986 - 1988 Staatliche Berufsfachschule für med.-techn. Laboratoriumsassistenten am Max-von-Pettenkofer Institut München

Beruflicher Werdegang

1988 - 1993 Tätigkeit als MTLA in der medizinischen Mikrobiologie an der LMU München, bei einem niedergelassenen Laborarzt und am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching

Hochschulstudium

WS 1996 / 1997 Pharmazie; LMU München

SS 1997 Humanmedizin; LMU München

März 1999 Ärztliche Vorprüfung

März 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2000	Beginn der Promotionsarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut der LMU-München im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ Betreuer: Prof. Dr. Klaus von der Helm Thema: Phänotypische Resistenzbestimmung gegenüber HIV-1-Proteaseinhibitoren - Ein Vergleich von DNA vs. RNA als Patientenmaterial
September 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2003 - Februar 2004	Beginn des Praktischen Jahres: 1. Trisemester: Chirurgie (Städt. Krankenhaus München-Neuperlach)
Februar 2004 - Mai 2004	2. Trisemester: Innere Medizin (Städt. Krankenhaus München-Neuperlach)
Mai 2004 - September 2004	3. Trisemester: Anästhesie (Klinikum der Universität München - Innenstadt)
Dezember 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<u>Weiterer persönlicher Werdegang</u>	
29. Januar 2005	Geburt eines Sohnes
Seitdem	Elternzeit, Fertigstellung der Dissertation

Publikationen

Veröffentlichungen:

Strommer U, Hoffmann D, Gehringer H, Bogner JR, Goebel FD, Nitschko H, von der Helm K (2002). HIV-1 protease phenotypic resistance: testing DNA versus RNA as source material. *Infection* **30** (Suppl 1): 22

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

Vorträge:

Strommer U, Hoffmann D, Gehringer H, Bogner JR, Goebel FD, Nitschko H, von der Helm K (2002). HIV-1 protease phenotypic resistance: testing DNA versus RNA as source material. ConVir 2002, München. *Infection* **30** (Suppl 1): 22

Strommer U, von der Helm K (2001). Phänotypische Resistenzbestimmung der viralen Protease bei HIV-Infizierten unter Kombinationstherapie. 1. Statusseminar des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“; München

Strommer U, von der Helm K (2001). HIV-protease resistance: testing DNA versus RNA as source material. 2. Statusseminar des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ zusammen mit dem DFG-Graduiertenkolleg „Infektionsbiologie“ / Tübingen; Herrsching