



**Evaluierung und Weiterentwicklung
eines
phänotypischen Resistenzassays
der HIV-Protease**

Medizinische
Gesellschaft
München



Munich Medical Society

meinen Eltern

Barbara & Wilfried Müller-Sarnowski

Aus dem
LEHRSTUHL FÜR VIROLOGIE
des
MAX VON PETTENKOFER-INSTITUTES
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Koszinowski

EVALUIERUNG UND WEITERENTWICKLUNG
EINES
PHÄNOTYPISCHEN RESISTENZASSAYS DER HIV-PROTEASE

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

vorgelegt von
Felix Müller-Sarnowski
aus München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Eberle
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Bogner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. H. Nitschko
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	08.11.2007

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einführung.....	3
2.1 Die besondere Bedeutung von Resistenztestungen bei HIV.....	3
2.2 Der am Max von Pettenkofer-Institut entwickelte Assay.....	4
2.3 Ziel dieser Arbeit.....	4
2.4 AIDS.....	5
2.4.1 Geschichte und Begriff.....	5
2.4.2 Epidemiologie.....	6
2.5 Das HI-Virus.....	8
2.5.1 Struktur.....	8
2.5.2 Genom.....	9
2.5.3 Replikationszyklus und Angriffspunkte der Pharmakotherapie.....	12
2.6 Die HIV-Protease.....	15
2.6.1 Bedeutung der Protease für die HIV-Replikation.....	15
2.6.2 Biochemische Eigenschaften und Struktur der HIV-Protease.....	17
2.6.3 Proteaseinhibitoren.....	18
2.6.4 PR-Inhibitoren als zentraler Bestandteil der Pharmakotherapie.....	20
2.6.5 Resistenzen der HIV-Protease.....	21
2.7 Resistenztestung.....	23
2.7.1 Phänotypische Testung.....	25
2.7.1.1 Zellkultur basierte Assays.....	25
2.7.1.2 Enzymkinetische Assays.....	25
2.7.2 Genotypische Resistenzprognosen.....	26
2.7.2.1 Regel-basierte Prognosen.....	26
2.7.2.2 Rein Datenbank-basierte Systeme: Virtual Phenotype.....	26
2.7.2.3 Struktur-basierte Phänotypisierung.....	27
2.7.3 Geno- und phänotypische Resistenztestung im Vergleich.....	27
3 Material.....	30
3.1 Geräte.....	30
3.2 Software.....	31

3.3 Verbrauchsmaterialien.....	31
3.4 Reagentien.....	32
3.4.1 Chemikalien.....	32
3.4.1.1 Lösungen und Puffer.....	32
3.4.1.2 Medien zur Bakterienanzucht.....	33
3.4.2 Proteine.....	34
3.4.2.1 Enzyme und Peptide.....	34
3.4.2.2 Substrate.....	34
3.4.2.3 Proteaseinhibitoren.....	35
3.4.3 DNA/RNA.....	35
3.4.3.1 Oligonukleotide und DNA-Fragmente.....	35
3.4.3.2 HIV-Isolate.....	36
3.4.3.2.1 Wildtypen.....	36
3.4.3.2.2 Proteasen aus der Routinediagnostik.....	36
3.4.3.2.3 Proteasen mit bekanntem Phänotyp.....	36
3.4.3.3 Vektoren.....	37
3.4.4 Organismen.....	37
3.4.5 Experimentiersätze (Kits).....	37
4 Methoden.....	38
4.1 Übersicht über den Ablauf des Assays.....	38
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	40
4.2.1 Extraktion von DNA und RNA aus Patientenmaterial.....	40
4.2.2 Reverse Transkription.....	40
4.2.3 Polymerasekettenreaktion.....	41
4.2.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	43
4.2.5 Photometrische Analyse der Nukleinsäuren.....	44
4.2.6 Restriktion.....	45
4.2.7 Ligation.....	46
4.2.8 Ethanol-Fällung.....	46
4.2.9 Präparation von Vektor.....	47
4.2.9.1 Herstellung von Vektor zur Klonierung.....	47
4.2.9.2 Kontrollpräparation.....	47

4.2.10 Sequenzierung.....	47
4.3 Mikrobiologische Methoden.....	48
4.3.1 Herstellung elektrokompeter Zellen.....	48
4.3.2 Elektrotransformation.....	48
4.3.3 Rekombinante Expression der HIV-Protease.....	49
4.4 Proteinchemische Methoden.....	49
4.4.1 Aufarbeitung der rekombinant exprimierten Protease.....	49
4.4.2 Säureextraktion.....	50
4.4.3 Ammoniumsulfatfällung.....	51
4.5 Messung der Proteaseaktivität.....	51
4.5.1 Das künstliche Substrat der HIV-Protease.....	51
4.5.2 Der Fluoreszenzassay.....	52
4.5.3 Erstellung von EDANS Eichkurven.....	55
4.6 Berechnung der Resistenzfaktoren.....	56
4.6.1 Kinetik kompetitiver Inhibitoren.....	56
4.6.1.1 Isosterie: Die Konzentrationen von Inhibitor und Substrat.....	57
4.6.1.2 Allosterie.....	58
4.6.1.2.1 Inhibitionskonstante (K_i) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m).....	59
4.6.1.2.2 Die scheinbare Inhibitionskonstante $K_i(\text{app})$	60
4.6.1.3 Bindungskinetik.....	61
4.6.2 Die besondere Bedeutung des Quotienten E/K_i	61
4.6.3 Das Rechenmodell.....	62
4.6.4 Die Inhibitionskonstante K_i als Maß der Resistenz.....	63
4.6.5 Nicht lineare Regressionsanalyse.....	64
4.6.5.1 Vorteile nicht linearer Regressionsanalyse.....	65
4.6.5.2 Praktische Durchführung der nicht linearen Regressionsanalyse.....	65
4.6.6 Resistenzfaktoren.....	66
5 Ergebnisse.....	67
5.1 Charakterisierung der untersuchten Proteasen.....	67
5.1.1 Proteasen mit genotypisch nicht eindeutig klassifizierbarem Resistenzmuster.....	67
5.1.2 Proteasen mit bekanntem phänotypischem Testergebnis.....	67
5.1.3 Wildtyp-Proteasen.....	68

5.2 Etablierung einer Wildtypreferenz.....	68
5.2.1 Inhibitionskonstanten der Protease in der Literatur.....	69
5.2.2 K_i der WT-Proteasen im Fluoreszenzassay des MvP.....	69
5.2.3 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.....	73
5.2.4 Festlegung einer Wildtypreferenz.....	74
5.2.5 Festlegung eines technischen Schwellenwertes (cutoff).....	74
5.3 Messtechnische Überlegungen zum Rechenmodell.....	75
5.3.1 Bedeutung von $[E]/K_i$ für den Fluoreszenzassay.....	75
5.3.1.1 Die Enzymkonzentration $[E]$ bei konstantem K_i	75
5.3.1.2 K_i bei konstanter Enzymkonzentration $[E]$	76
5.3.1.3 Das Verhältnis der Enzymkonzentration $[E]$ zu K_i	77
5.3.1.4 Einfluss der Substratkonzentration auf $[E]/K_i$	78
5.3.2 Konsequenz für die Wahl der Messbedingungen.....	78
5.4 Bestimmung der Qualität des Assays.....	79
5.4.1 Qualität der Messung.....	79
5.4.1.1 Messbedingungen.....	79
5.4.1.2 Analyse der Messgrößen des Assays.....	80
5.4.1.2.1 Die Inhibitorkonzentration $[I]$	80
5.4.1.2.2 Der Substratumsatz v	81
5.4.1.2.2.1 Der Substratumsatz in Abwesenheit von Inhibitor (v_0).....	81
5.4.1.2.2.2 Der Substratumsatz in Gegenwart von Inhibitor (v_i).....	83
5.4.1.2.2.3 Systematische Fehler im Substratumsatz v	87
5.4.1.2.3 Die Enzymkonzentration $[E]$	88
5.4.1.2.3.1 Bestimmung von $[E]$ via Immunoblot.....	88
5.4.1.2.3.2 Bestimmung von $[E]$ via Titration.....	89
5.4.1.2.3.3 Enzymkonzentration $[E]$ als 2. Variable.....	89
5.4.1.3 Algorithmus der Messdatenaufbereitung für die Regressionsanalyse.....	90
5.4.2 Qualität der Regressionsanalyse.....	90
5.4.2.1 Einfluss einzelner Messpunkte.....	91
5.4.2.2 Konsequenzen für das Layout der Mikrotiterplatten.....	92
5.4.2.3 Gewichtete Regression.....	95
5.5 Weiterentwicklung des Rechenmodells.....	95

5.5.1 Einfache Regression versus Multiple Regression.....	96
5.5.2 Korrektur systematischer Fehler bei multipler Regression.....	99
5.6 Ergebnisse der Resistenzmessung.....	100
6 Diskussion.....	114
6.1 Vergleich der Rechenmodelle.....	114
6.1.1 Inhibitionskonstanten und Resistenzfaktoren.....	114
6.1.1.1 Tendenziell höhere Resistenzfaktoren.....	114
6.1.1.2 Übereinstimmung mit genotypischer Prognose.....	115
6.1.2 Enzymkonzentration [E].....	115
6.1.3 Prinzipielle Äquivalenz der Rechenmodelle.....	116
6.1.4 Robustheit gegenüber schwierig regredierbaren Daten.....	116
6.1.5 Datenausschöpfung.....	117
6.1.6 Korrektur systematischer Fehler.....	117
6.1.7 Standardisierung.....	117
6.2 Vergleich mit etablierten Testsystemen.....	118
6.2.1 Meßbereich.....	118
6.2.2 Reproduzierbarkeit.....	118
6.2.3 Kosten.....	118
6.2.4 Zeitaufwand.....	118
6.2.5 Vergleich mit genotypischen Ergebnissen.....	119
6.2.6 Vergleich mit phänotypischen Ergebnissen.....	119
6.2.7 Konkurrenzfähigkeit.....	120
6.2.7.1 Konkurrenzfähigkeit zu zellkulturbasierten Assays.....	120
6.2.7.2 Konkurrenzfähigkeit zu genotypischen Prognosen.....	120
6.3 Sinnvolle Einsatzfelder der Assays.....	121
7 Anhang.....	122
7.1 Danksagung.....	122
7.2 Open Source.....	122
7.3 Abkürzungen und Akronyme.....	123
7.3.1 Code der Aminosäuren.....	126
7.3.2 Inhibitoren der HIV-Protease.....	127
7.4 Abbildungsverzeichnis.....	128

7.5 Tabellenverzeichnis.....	131
7.6 Formelverzeichnis.....	133
7.7 Exkursverzeichnis.....	133
7.8 Literaturverzeichnis.....	134
7.9 Lebenslauf.....	146
7.10 Impressum.....	148

1 ZUSAMMENFASSUNG

Am Max von Pettenkofer-Institut wurde ein enzymkinetischer Assay der HIV-Protease entwickelt. Nach spezifischer Amplifikation des Genoms der HIV-Protease aus Blut infizierter Patienten wird das Enzym rekombinant exprimiert und seine Aktivität in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen mithilfe eines künstlichen Substrates in einem Fluoreszenzassay ermittelt. Ein Vergleich mit Wildtypprotease erlaubt die Berechnung anschaulicher Resistenzfaktoren. Insbesondere hinsichtlich Geschwindigkeit, Kosten und Spezifität stellt das System eine attraktive Alternative zu den bekannten Verfahren dar. Bislang wurde es vorrangig für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung des Assays für die virologische Routinediagnostik zu evaluieren und ihn für den Einsatz als diagnostisches Werkzeug weiter zu entwickeln.

Zunächst wurden dafür eine Wildtyppreferenz und Grenzwerte für eine Klassifikation der Testergebnisse etabliert. Messbereich, Reproduzierbarkeit und Ergebnisse wurden sowohl mit denen zellkulturbasierter phänotypischer Assays, als auch mit genotypischen Prognosen verglichen.

Die kritische Analyse des Testsystems zeigte, dass die entscheidenden Schwächen weniger im experimentellen Procedere, als bei der Auswertung der gemessenen Daten zu suchen sind. Die enzymkinetischen Messdaten des Assays werden zur Berechnung der Resistenzfaktoren in einer nicht linearen Regression auf ein komplexes mathematisches Modell gefittet. Schon geringe Änderungen des Berechnungsmodus, Messfehler und Alteration der Messbedingungen können drastischen Einfluss auf die Resultate nehmen.

Um für die Kalkulation mit nicht linearer Regression geeignete Messergebnisse zu erzielen, bedarf es einer, von vornherein auf das jeweilige Enzym individuell abgestimmten, Versuchsplanung und der strikten Einhaltung spezifischer Konditionen während des Experiments. Im ersten Schritt wurde das theoretische Ideal optimaler Messbedingungen hinsichtlich der anschließenden Berechnung von Resistenzfaktoren erarbeitet. Anschließend wurden die realen Messbedingungen diesem hypothetischen Optimum u. a. durch Neugestaltung des Mikrotiterplattenlayouts weitmöglichst angenähert.

Wie bereits vorausgehende Arbeiten bemängelten, bildete das bisherige Rechenmodell die realen Gegebenheiten des Assays nicht exakt ab (Hoffmann 2002). Durch eine Weiterentwicklung des Rechenmodells unter Verwendung so genannter multipler nicht linearer Regressionsanalyse gelang es die bestehenden Inkonsistenzen zu beheben.

Das neue Modell ist darüber hinaus in der Lage systematische Messfehler zu kompensieren. Die prinzipiellen Möglichkeiten dieser Fehlerkorrektur wurden durch Integration eines einfachen Korrektursummanden demonstriert. In der Zukunft sind komplexere und dafür präzisere Terme erstrebenswert.

Die bessere Ausschöpfung der vorhandenen Messdaten zählt zu den weiteren entscheidenden Vorteilen. Da durch die multiple Regression nicht nur die Ergebnisse der jeweiligen Messreihe eines Inhibitors, sondern die der gesamten Mikrotiterplatte einbezogen werden, wird die Regressionsanalyse auf eine breitere Datenbasis gestellt. Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit wurden erhöht.

Die nicht lineare Regressionsanalyse ist auch hinsichtlich Beschleunigung und Standardisierung des Auswerteverfahrens deutlich überlegen. Die Inhibitionskonstanten aller Inhibitoren werden gleichzeitig in einem einzigen Gleichungssystem bestimmt.

Die hier validierten Techniken sind prinzipiell auch auf andere zukünftige enzymkinetische Resistenzassays übertragbar. Virale Proteasen sind nämlich u. a. in der Therapie des Hepatitis C Virus (HCV) ein vielversprechendes Ziel (Huang et al. 2006; Hugle & Cerny 2003).

Enzymkinetische Untersuchungen der HIV-Protease von Patienten sind mit dem weiterentwickelten Assay reif für die klinische Diagnostik.

Der Test bietet sich u. a. zur Analyse neu entwickelter Inhibitoren an. Im Unterschied zu zellkultur-basierten Verfahren untersucht er spezifisch die Wirkung auf die HIV-Protease und nicht pauschal die gesamte virale Replikationsfähigkeit.

Für eine direkte Konkurrenz mit zellkultur-basierten Assays fehlen aktuell noch enzymkinetische Testsysteme der Reversen Transkriptase, dem zweiten derzeit medikamentös hemmbaren Enzym des HI-Virus. Die hierfür notwendigen Methoden wurden am Max von Pettenkofer-Institut ebenfalls etabliert, sind jedoch bisher zu wenig robust für die Routinediagnostik (Obermeier 2006).

Eine vielversprechende Nische sind jedoch schon heute Proteasen mit unklaren genotypischen Resultaten, da der Assay modular auf die aus genotypischen Untersuchungen ohnehin vorhandenen PCR-Produkte aufsetzt.

Gegenüber zellkultur-basierten Assays bestehen sowohl hinsichtlich des Zeitaufwandes, als auch der Kosten klare ökonomische Vorteile. Der Einsatz von in vitro Translationssystemen (Hoffmann et al. 2005) an Stelle rekombinanter Expression lässt weiteres zeitliches und finanzielles Sparpotential erkennen.

Dem klinisch tätigen Arzt können so nicht erst nach Wochen, sondern schon nach wenigen Tagen zuverlässige phänotypische Testergebnisse zur Unterstützung seiner Therapieentscheidung angeboten werden. Bei gleichzeitig moderateren Preisen für eine Untersuchung bleibt zu hoffen, dass phänotypische Testungen der HIV-Protease zukünftig einem breiteren Patientengut zugänglich werden.

2 EINFÜHRUNG

2.1 DIE BESONDERE BEDEUTUNG VON RESISTENZTESTUNGEN BEI HIV

Die aktuell verfügbare antiretrovirale Kombinationstherapie, die so genannte *hochwirksame antiretrovirale Therapie* (HAART¹), bringt die virale Replikation in HIV-infizierten Patienten weitestgehend zum Erliegen. Das ermöglicht den Patienten einen - teilweise über Jahre hinweg - vergleichsweise beschwerdearmen Erkrankungsverlauf. Eine Heilung ist jedoch bisher wegen der Integration des Virus in das Wirtsgenom nicht möglich.

Das Sistieren der Virusreplikation kann nur durch disziplinierte, dauerhafte Einnahme der HAART aufrecht erhalten werden. Aus heutiger Sicht ist eine lebenslange Therapie deshalb unabdingbar.

Abgesehen von Nebenwirkungen, wie z. B. Lipodystrophien, zählt die Entwicklung von Resistenzen zu den vorrangigen Komplikationen einer langfristigen HAART.

Resistenzen entstehen, da die HAART nicht in der Lage ist, die Virusreplikation überall im Körper vollständig zu supprimieren. Gewebe, in denen die Bioverfügbarkeit der antiretroviralen Therapeutika gering ist, sind ein Rückzugsgebiet für das HI-Virus (Pierson et al. 2000). Es wird ein Selektionsdruck zur Ausbildung von Resistenzen geschaffen.

Resistenzen entwickeln sich im Falle des HI-Virus besonders leicht: Das Genom besteht aus, im Vergleich zu DNA deutlich instabilerer, RNA, der viruseigenen Polymerase fehlen Reparaturmechanismen, die Zahl der von einer infizierten Zelle generierten Viruspartikel ist hoch und die Behandlungsdauer lang.

Auch die nicht sachgemäße Verwendung antiretroviraler Wirkstoffe, die z. B. durch schlechte *Compliance*² von Patienten oder unkontrollierte Abgabe von Medikamenten in Entwicklungsländern bedingt ist (Brugha 2003), trägt zur Ausbildung von Resistenzen bei.

Somit besteht die latente Gefahr eines Wiederaufflammens der Infektion. Bei einer kontinuierlichen Zunahme der Prävalenz resistenter HI-Viren (Seite 23), muss damit gerechnet werden, dass ein Großteil der Patienten im Laufe der Behandlung von einem resistenzbedingten Therapieversagen betroffen sein wird. Dann sind Resistenzassays für eine auf das Resistenzprofil des Virus zugeschnittene Behandlung unverzichtbar.

Die meisten HIV-infizierten leben in Entwicklungsländern. In der Praxis sind die für eine erfolgreiche langfristige Therapie wichtigen HIV-Resistenzassays wegen hoher Kosten und den erforderlichen technischen Ressourcen Patienten in Industrienationen vorbehalten. Der Bedarf an einfachen, schnelleren und preiswerteren Verfahren ist somit groß.

¹ engl. *highly active antiretroviral therapy* (HAART)

² engl. *compliance* deut. Gehorsam, Ergebnis; bezeichnet im medizinischen Kontext wie zuverlässig durch den Arzt ausgesprochene Therapieempfehlungen vom Patienten befolgt werden.

2.2 DER AM MAX VON PETTENKOFER-INSTITUT ENTWICKELTE ASSAY

Am Max von Pettenkofer-Institut (MvP) wurde in den vergangenen Jahren ein phänotypischer Resistenzassay für Proteaseinhibitoren - einem zentralen Bestandteil der HAART - entwickelt. Im Gegensatz zu den bisher vorherrschenden zellkulturbasierten Testsystemen beruht das Verfahren auf direkter enzymkinetischer Messung der Proteaseaktivität und verspricht insbesondere den Anforderungen nach schnellerer Durchführbarkeit und geringeren Kosten gerecht zu werden (Hoffmann 2002).

Bereits Mitte der 1990er Jahre war die rekombinante Expression von HIV-Protease in *E. coli* etabliert worden (von der Helm et al. 1994). Darauf aufbauend wurde ein Assay für die Messung von Proteaseaktivität aus Patientenmaterial mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie³ (HPLC) konstruiert (Gehring et al. 2003). Der Test wurde zunächst zu einem Fluoreszenzassay in Küvetten, später im Mikrotiterplattenformat weiterentwickelt (Hoffmann 2002; Hoffmann et al. 2003). Prinzipiell scheint die Methode auch auf *in vitro* Translationssysteme⁴ wie das *Rapid-Translation-System*TM⁵ (RTS) der Firma Roche® übertragbar (Hoffmann et al. 2005). Der für eine Testung erforderliche Zeitaufwand reduziert sich dabei, von aktuell etwa einer Arbeitswoche auf wenige Tage. Zudem können kritische Arbeitsschritte, wie z. B. die Klonierung von Patientenmaterial in Bakterien und die ressourcenintensive Aufreinigung der rekombinant hergestellten Protease, umgangen werden (Abbildung 4.1 Seite 39). Eine zellfreie *in vitro* Translation, direkt vom PCR-Produkt, verspricht gleichzeitig auch Vorteile bei Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Testergebnisse.

2.3 ZIEL DIESER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war es, den am Max von Pettenkofer-Institut etablierten enzymkinetischen Assay der HIV-Protease zu einem diagnostischen Werkzeug der Routinediagnostik weiter zu entwickeln.

Die bisherige Entwicklung des Assays konzentrierte sich auf die Verfeinerung der experimentellen, technischen Verfahren. Da die vom Testsystem ausgegebenen Resistenzfaktoren nicht auf direkter Messung beruhen, sondern durch nicht lineare Regression der Messdaten auf komplexe mathematische Modelle der Enzymaktivität ermittelt werden, hängen die Ergebnisse ganz erheblich vom angewandten Auswerteverfahren ab. Ein standardisierter, systematischer Algorithmus zur Beurteilung der gemessenen enzymkinetischen Resistenzprofile, wie er für den Einsatz in der klinischen Routinediagnostik zwingend erforderlich ist, fehlte bislang. Das Rechenmodell war mit logischen Inkonsistenzen behaftet, bildete die Bedingungen des Assays im Detail nicht exakt ab. Der Schwerpunkt der Weiterentwicklung hin zu einem Testsystem der Routinediagnostik lag daher auf der Optimierung des Auswerteverfahrens.

³ engl. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC); analytische Methode zu Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen.

⁴ zellfreie Proteinexpression

⁵ Kommerziell erhältlicher Experimentiersatz (engl. *Kit*) zur zellfreien Proteinbiosynthese *in vitro*.

Diese Arbeit schlägt einen Algorithmus vor, der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit garantiert und gleichzeitig versucht verfahrensbedingte, wie auch praktische Unzulänglichkeiten des Assays zu kompensieren.

Für den Einsatz in der klinischen Praxis wichtige Größen, wie Messbereich und Reproduzierbarkeit, sollen untersucht und durch Schaffung einer einheitlichen Wildtypreferenz und ein verändertes Layout der Messplatten optimiert werden.

Ein Vergleich mit herkömmlichen genotypischen und phänotypischen Assays soll die Testergebnisse des neuen Verfahrens evaluieren, Vor- und Nachteile aufzeigen und das mögliche, zukünftige Einsatzfeld definieren.

Für die Weiterentwicklung des Rechenmodells soll die Anwendung einer **globalen** (synonym **multiplen**) nicht linearen Regressionsanalyse erprobt werden.

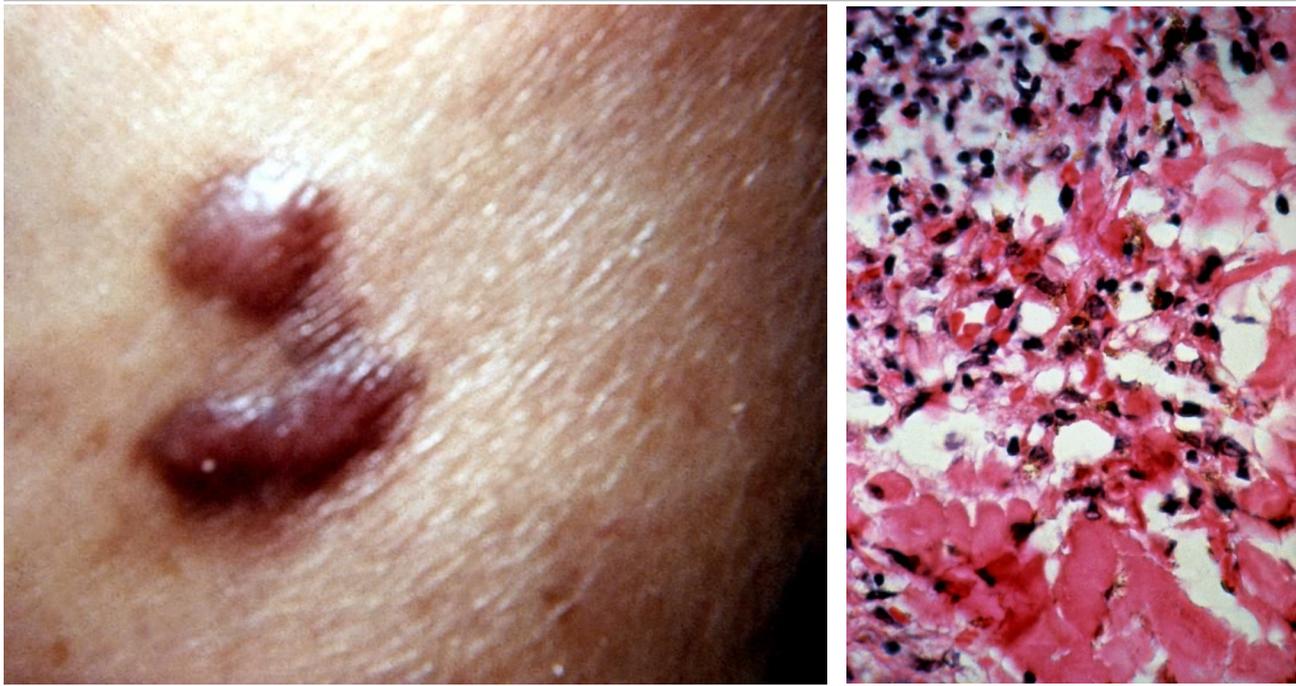
2.4 AIDS

2.4.1 GESCHICHTE UND BEGRIFF

Das Akronym AIDS geht auf ein Symposium in Washington am 27. Juli 1982 zurück (Anonymous 2006; Anonymous (NIH) 2001). Es verdrängte zuvor übliche Begriffe wie KSOI (engl. *Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections*) (CDC 1982c), *gay compromise syndrome* (Brennan & Durack 1981), *gay cancer* (Anonymous 1982) oder GRID (engl. *gay-related immune deficiency*). AIDS wurde kurz darauf erstmals in wissenschaftlichen Publikationen exakt definiert (CDC 1982a; Marx 1982).

Die Aufmerksamkeit einer breiteren Öffentlichkeit erlangte das Syndrom als zunächst idiopathische Immunschwäche zu Beginn der 1980er Jahre durch Berichte über opportunistische Krankheitsbilder, insbesondere *Kaposi Sarkoma* und Pneumonien durch *Pneumozystis carinii*, unter zuvor gesunden Homosexuellen und an Hämophilie Erkrankten (CDC 1981; CDC 1982b; CDC 1982c; CDC 1982d; Gottlieb et al. 1981).

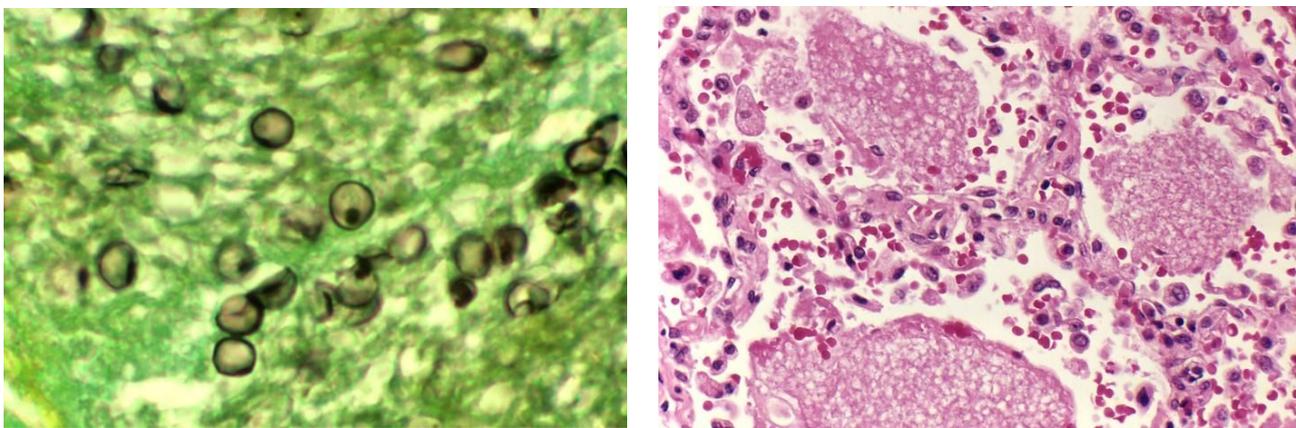
Abbildung 2.1: Kaposi Sarkom makroskopisch und histologisch



links: Kaposi Sarkom makroskopisch. Dr. Steve Kraus (1981), CDC; PHIL⁶ ID#6436

rechts: Histologischer Schnitt eines Kaposisarkoms. Charakteristisch sind die Überbleibsel extravasierter Erythrozyten und Hämosiderinablagerungen. Dr. Steve Kraus (1981), CDC; PHIL D#6432

Abbildung 2.2: Pneumocystis carinii



links: Der histopathologische Schnitt von Lungengewebe zeigt die typische Morphologie der Zysten von *Pneumocystis carinii* in einer Methenamin-Silber-Färbung. Dr. Edwin P. Ewing (1983/84), CDC; PHIL ID#960

rechts: Das Lungengewebe zeigt das für eine Infektion mit *Pneumocystis carinii* typische alveoläre Exsudat. Dr. Edwin P. Ewing (1983/84), CDC; PHIL D#959

2.4.2 EPIDEMIOLOGIE

Nach Schätzungen von UNAIDS⁷ waren 2006 weltweit 39,5 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. Die Zahl der Neuinfektionen wird auf 4,3 Millionen Menschen beziffert. Das entspricht über 11000 Neuinfektionen täglich. Die Prävalenz ist damit auf knapp 1 % der Weltbevölkerung gestie-

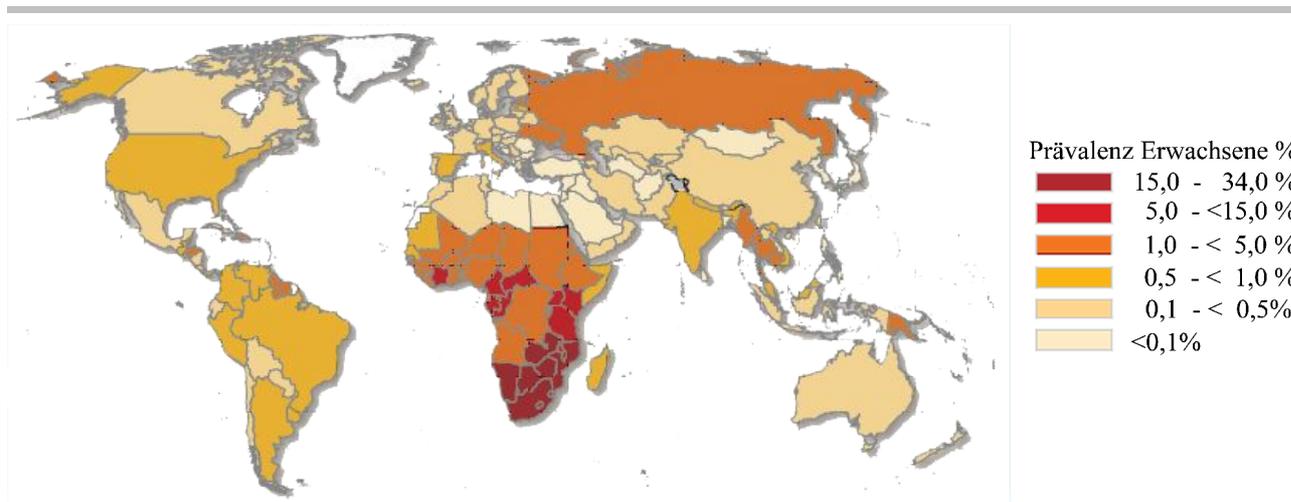
⁶ *Public Health Image Library* (PHIL) der *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, USA (<http://phil.cdc.gov/phil>)

⁷ Koordinierungsprogramm der Vereinten Nationen mit dem Ziel, die HIV / AIDS-Pandemie zu bekämpfen. Es entstand 1996 aus dem *Global Program on HIV / AIDS* der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

gen. Im Jahr 2006 forderte AIDS 2,9 Millionen Tote. AIDS ist eine Erkrankung der Armen: Mehr als 95 % der Infektionen finden in Ländern mit niedrigen und mittleren Einkommen statt.

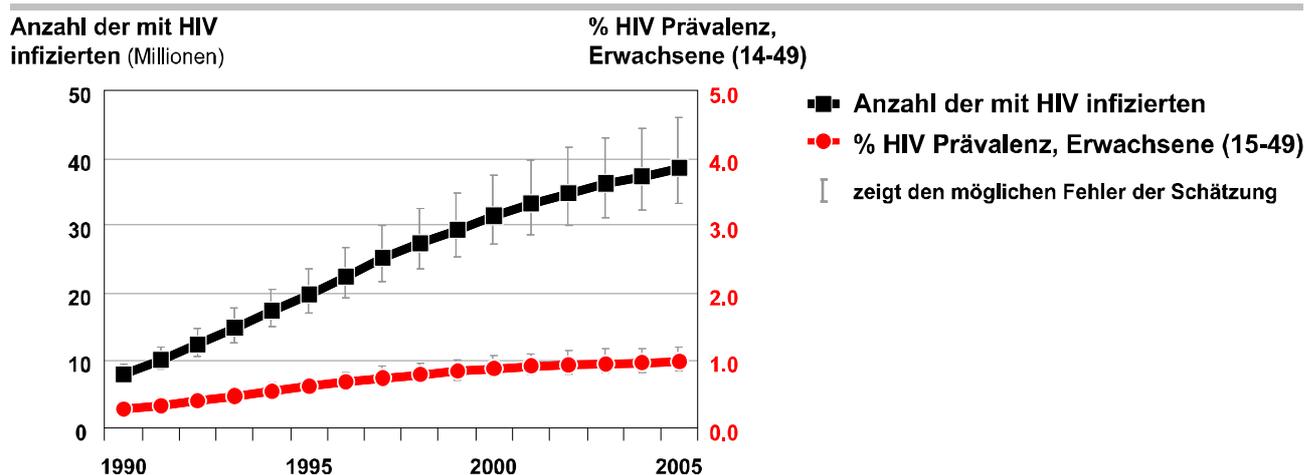
In Deutschland waren Ende 2006 nach Daten des Robert-Koch-Institutes (RKI) 56000 Menschen mit dem HI-Virus infiziert. Die Zahl der Neuinfektionen lag bei 2700. Bei den Infektionswegen war gemäß Schätzungen mit 70 % der homosexuelle Geschlechtsverkehr unter Männern führend. Auf heterosexuelle Kontakte gehen in etwa 20 % der Neuinfektionen zurück, 9 % auf i.v. Substanzabusus und 1 % auf Mutter-Kind-Transmission. Seit Beginn der Epidemie wurden in Deutschland 82000 Infizierte registriert, von denen bisher⁸ 32500 an AIDS erkrankten. Insgesamt waren 26000 Todesfälle zu beklagen.

Abbildung 2.3: AIDS Epidemiologie



Modifizierte Darstellungen des UNAIDS press kit 2006 (Download <http://www.unaids.org>). Schätzungen.

Abbildung 2.4: Entwicklung der HIV-Prävalenz



Modifizierte Darstellungen des UNAIDS press kit 2006 (Download <http://www.unaids.org>). Schätzungen.

⁸ Stand 2006; Angaben des Robert-Koch-Institutes (RKI)

2.5 DAS HI-VIRUS

Humanes Immundefizienz Virus (HIV)⁹ ist die vom Internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren¹⁰ seit 1986 empfohlene Bezeichnung (Coffin et al. 1986) für den Erreger, der Anfang der 1980er Jahre unter den Namen Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV), humanes T-Zell-Leukämie-Virus III (HTLV III) (Popovic et al. 1984) oder AIDS-assoziiertes Retrovirus (ARV) bekannt wurde.

Die erste (posthum) nachgewiesene HIV-1 Infektion datiert in das Jahr 1959 (Zhu et al. 1998). Erstmals wurde das HI-Virus Typ 1 1983 aus Patienten isoliert und als Verursacher von AIDS identifiziert (Barre-Sinoussi et al. 1983). Im Jahr 1986 wurde bei westafrikanischen AIDS Patienten ein weiterer Subtyp entdeckt (Clavel et al. 1986; Reeves & Doms 2002) und als HIV Typ 2¹¹ bezeichnet.

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren¹² und wird dem Genus der Lentiviridae¹³ zugerechnet. Die Familie der Retroviridae umfasst darüber hinaus auch Onco- und Spumaviren. Nahe Verwandte des HI-Virus sind auch bei Affe (SIV¹⁴), Katze (FIV¹⁵) und Rind bekannt (BIV¹⁶).

2.5.1 STRUKTUR

Das HI-Virus ist annähernd sphärisch und hat einen Durchmesser von ca. 145 nm (Briggs et al. 2003). Die äußere Hülle besteht aus einer Lipidmembran, die bei der Knospung aus Zellmembran der Wirtszelle entsteht (Kaplan 2002; Larson et al. 2005). Darin eingebettet sind 72 ca. 10 nm große gp120¹⁷ Trimere, die mit dem transmembranen gp41 nicht-kovalent verbunden sind (Gelderblom 1991; Gelderblom 1997). Das gp120 bindet an den – bevorzugt auf der Oberfläche von T-Lymphozyten vorkommenden - CD4 Rezeptor und nimmt zusammen mit gp41 eine Schlüsselstellung bei Andocken und anschließender Fusion mit der Wirtszelle ein (Weiss 2003). Darunter liegt die so genannte Matrix aus p17 (Matrixprotein; MA) (Fiorentini et al. 2006). Das meist konische Kapsid aus p24 (Kapsidprotein; CA; *core antigen*) enthält zwei Kopien der Erbinformation: Einen knapp 10000 Nukleotide¹⁸ langen, an Nukleoprotein (p7; NC) und Reverse Transkriptase (RT; p51)

⁹ HIV Typ 1: **ICTVdb**: Virus Code: 00.061.1.06.009. Virus accession number: 61106009; **NCBI Taxonomy**: ID 11676

¹⁰International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) seit 1971 bestehendes Gremium innerhalb der *International Union of Microbiological Societies* (<http://www.iums.org>; Taxonomiedatenbank ICTVdb <http://phene.cpmc.columbia.edu>)

¹¹HIV Typ 2: **ICTVdb**: Virus Code: 61.0.6.5.002. Virus Accession number: 61065002; **NCBI Taxonomy**: ID 11709

¹²Retroviridae: **ICTVdb**: Virus Code: 61. Virus Accession number: 61000000; **NCBI Taxonomy**: ID 11632

¹³Lentiviridae: **ICTVdb**: Virus Code: 61.0.6. Virus Accession number: 61060000; **NCBI Taxonomy**: ID 11646

¹⁴Simian Immunodeficiency Virus (engl. *simian* = deut. affenartig) **NCBI Taxonomy**: ID 11723

¹⁵Feline Immunodeficiency Virus (engl. *feline* = deut. katzenartig) **NCBI Taxonomy**: ID 11673

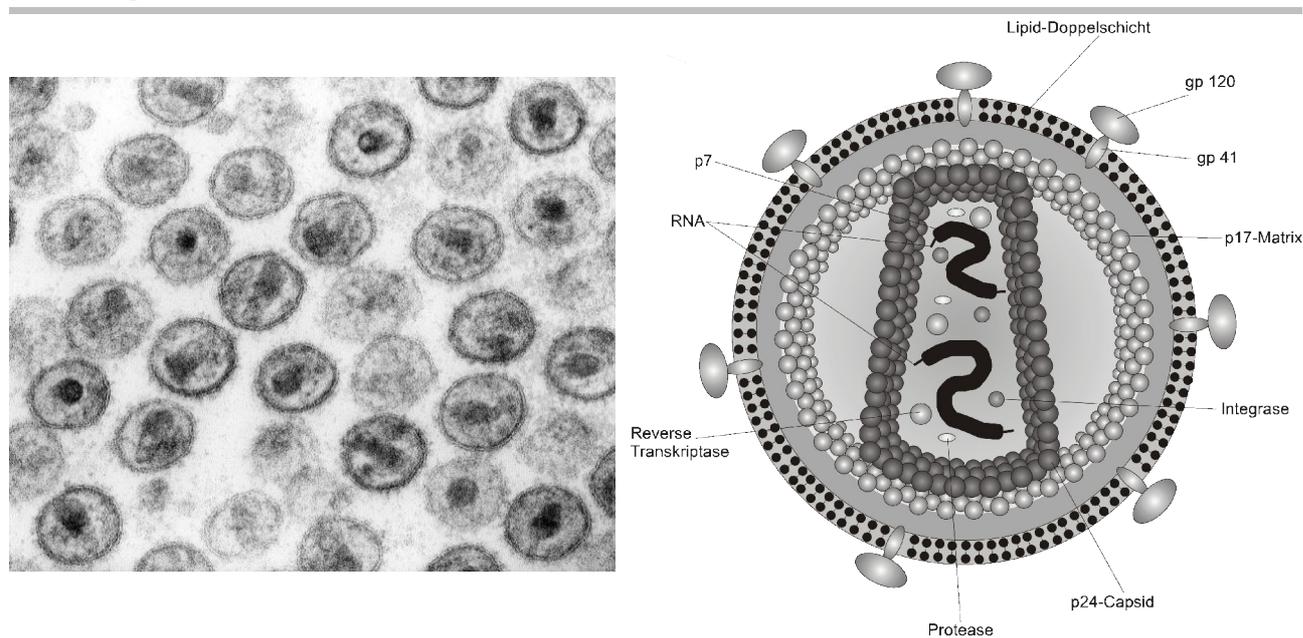
¹⁶Bovine Immunodeficiency Virus (engl. *bovine* = deut. rinderartig) **NCBI Taxonomy**: ID 11657

¹⁷Bestandteile des HI-Virus werden mit p für Protein bzw. gp für Glykoprotein gefolgt von ihrem Gewicht in Kilodalton bezeichnet.

¹⁸Das Referenzgenom von HIV Typ1 HXB2 umfasst genau 9719, der Wildtyp BEN bei HIV Typ2 genau 10359 Nukleotide

gebundenen, positiven RNAstrang (Welker et al. 2000). Neben der Reversen Transkriptase¹⁹ enthält das Kapsid die beiden viruseigenen Enzyme Protease (PR; p11) und Integrase (IN; p31).

Abbildung 2.5: Struktur des HI-Virus



links: Elektronenmikroskopische Aufnahme des HI-Virus. Dr. Edwin P. Ewing, CDC; PHIL ID#948

rechts: Schematische Struktur des HI-Virus. *Wikimedia Commons*²⁰; originärer Upload am 22. Mai 2004 durch den Autor Daniel Beyer, Ausschnitt.

2.5.2 GENOM

Referenzgenom ist für HIV Typ 1 der Wildtyp HXB2 (9719 bp), für HIV Typ 2 der Wildtyp BEN (10359 bp). Positionsangaben im Genom sollten gemäß den Empfehlungen der *HIV Sequence Database*²¹ angegeben werden (Korber et al. 1998).

Die prinzipielle Struktur retroviraler Genome lässt sich vereinfacht auf die Formel 5' LTR-gag-pol-env-LTR 3' reduzieren. Gag steht für „Gruppenantigen“ (engl. *group-antigen*), pol für „Polymerase“ (engl. *polymerase*) und env für „Hülle“ (engl. *envelope*). Diese offenen Leseraster (engl. *open reading frame*, ORF) werden von langen terminalen repetitiven Sequenzen (engl. *long terminal repeats*, LTR) flankiert, an welchen das Virusgenom sich in die zelluläre DNA integriert. Im Bereich der LTRs finden sich neben einer TATA-box auch der Transkriptionsfaktor Sp1 und NF-κB Bindungsstellen, denen eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Transkription zukommt (Freed 2001).

Gag umfasst das Matrixprotein p17, das Kapsidprotein p24 und das Nukleokapsid p7. Die Bezeichnung „Polymerase“ des pol-Gens bezieht sich auf die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige

¹⁹Die RT enthält als Untereinheit die Rnase H (RH; p15) und wird deshalb oft auch als p66 bezeichnet.

²⁰*Wikimedia Commons* (<http://commons.wikimedia.org>); zentrales Bildarchiv der freien Internetzyklopädie *Wikipedia* (<http://www.wikipedia.org>)

²¹Die *HIV Sequence Database* ist eine Einrichtung der Los Alamos Laboratorien (USA) und im Internet unter <http://www.hiv.lanl.gov> zu erreichen.

2. EINFÜHRUNG

DNA-Polymerase²². Anders als der Name suggeriert, codiert pol aber auch die viruseigene Protease und Integrase. Pol ist somit genetische Heimat aller HIV-eigenen Enzyme. Bei der Translation von env wird das gp160 Vorläuferprotein gebildet, aus dem durch Spaltung gp120 und gp41 entstehen, deren Aufgabe Andocken und anschließende Fusion mit der Wirtszelle sind.

Die drei großen, in allen Retroviren vorkommenden, ORFs, gag, pol und env, sind für die Virusstruktur entscheidend. Daneben besitzt HIV die deutlich kleineren, regulatorischen Gene tat, nef und rev sowie die Polypeptide vif, vpr und vpu, die Spezialaufgaben erfüllen.

Exemplarisch sei hier lediglich die Funktion von nef erwähnt, das eine wichtige Rolle bei der Immunevasion²³ spielt (Das & Jameel 2005). Sein Genprodukt induziert eine Herunterregulation von CD4 (Aiken et al. 1994) und MHC I (Collins et al. 1998).

Eine Übersicht über die bekannten HIV-Proteine gibt Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Übersicht über die bekannten Proteine des HI-Virus

Gen	Struktur	Größe	Funktion	Lokalisation
<i>gag</i>				
	MA	p17	Matrixprotein; Grundbaustein der Matrix	Virion
	CA	p24	Kapsidprotein, Grundbaustein des Kapsids	Virion
	NC	p7	Nukleokapsid; bindet RNA	Virion
		p6	bindet vpr	Virion
<i>pol</i>				
	Protease (PR)	p15	Prozessierung des gag-pol-Präkursors	Virion
	Reverse-Transkriptase (RT)	p66/ p51	Reverse Transkription der viralen RNA in cDNA	Virion
	RNase H	p15	Abbau von RNA-Primern	Virion
	Integrase (IN)	p31	Integration des Provirus in das Wirtsgenom	Virion
env		gp120/ gp41	Hüllproteine, Bindung des CD4 T-Zell Rezeptors und Fusion mit der Wirtszelle	Plasmamembran, Virushülle
tat		p16/p14	Transkriptionsfaktor	vorwiegend Nukleus
rev		p19	u. a. für RNA Transport und Stabilität verantwortlich	vorwiegend Nukleus
vif		p23	fördert Reifung und Infektiosität degradiert APOBECs ²⁴ (Franca et al. 2006; Harris & Liddament 2004; Malim 2006)	Zytoplasma, Virion
vpr		p10-15	fördert den Transport des Präintegrationskomplexes zum Zellkern hemmt die Zellteilung; hält infizierte Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus	Virion, Nukleus
vpu		p16	an der Knospung neuer HIV-Viren beteiligt zerstört CD4 der Wirtszelle im endoplasmatischen Retikulum	Membranprotein
nef		p15-p27	Herunterregulation von CD4 und MHC I	Plasmamembran, Zytoplasma
vpx		p12-p16	vpr-Homolog in HIV-2 und SIV. In HIV-1 nicht existent	Virion

Modifiziert nach einer Übersicht des *HIV Sequence Compendiums 2005* (Los Alamos National Laboratory 2005)

²²Die Reverse Transkriptase hat RNA- wie auch DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität.

²³Als Immunevasion bezeichnet man Mechanismen von Viren Angriffen durch das Immunsystems des Wirtes zu entgehen.

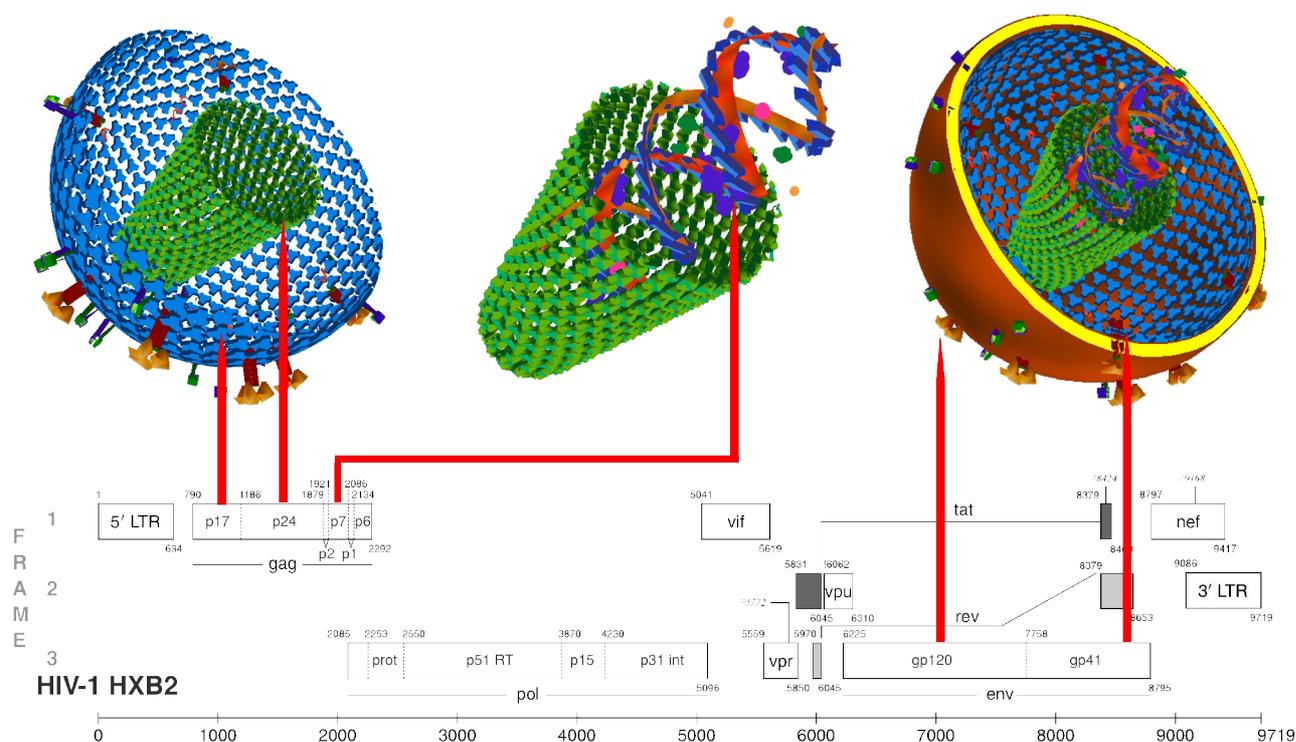
²⁴Acronym für engl. *apolipoprotein B editing catalytic polypeptide*

Da *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* *in vitro* nicht zwingend für eine erfolgreiche Replikation des Virus notwendig sind (Levy JA 1998; Luciw 1996), werden sie auch als akzessorische Gene bezeichnet.

Bemerkenswert ist, dass das HIV-Genom in insgesamt 3 verschiedenen Leserastern translatiert wird (Abbildung 2.6). Entscheidend für ein replikationsfähiges Virus ist ein *-1 ribosomal frameshift* zwischen *gag* und *pol*, die in unterschiedlichen Leserastern liegen. Er wird durch eine *slippery sequence* und eine Haarnadelschleife (engl. *stem loop*) der RNA begünstigt. So entsteht in etwa 95 % der Fälle das *gag*-Precursor-Protein und in 5 % der Fälle das *gag-pol*-Fusions-Protein (Jacks et al. 1988). Ein größere Verschiebung in diesem Verhältnis führt zu defekten, nicht mehr zur Replikation fähigen, Viren.

Stoffe, die dieses *frameshift* beeinflussen, werden deshalb als potentielle Therapeutika diskutiert (Hung et al. 1998).

Abbildung 2.6: Genom-Struktur-Beziehung der Lentiviridae am Beispiel HIV



Genomstruktur aus dem *HIV Sequence Compendium 2005* (Los Alamos National Laboratory 2005); die 3D-Struktur-Bilder wurden mit dem Programm 3DHIV (<http://hiv.sourceforge.net>) von Dan Stowell erstellt.

Die hohe Mutationsrate von HIV führt zu einer enormen genetischen Variationsbreite. Es sind drei Gruppen bekannt:

- HIV-1: M (*Major/Main*), verantwortlich für 96 % aller Infektionen weltweit,
- N (*Non-M, Non-O/New*) (Simon et al. 1998) und
- O (*Outlier*) (Gürtler et al. 1994).

Die Abweichungen zwischen M und O betragen zwischen 30 % und 50 %. Gruppe M ist weiter in die Subtypen A-K untergliedert. Auch zwischen diesen Subtypen existieren in der Sequenz des env-Hüllproteins noch Unterschiede zwischen 25 % und 35 % (Kandathil et al. 2005). Diese enorme Variabilität des Hüllproteins²⁵ ist einer der Gründe für das bisherige Scheitern der Entwicklung einer HIV-Vakzine (Giri et al. 2004). In Europa dominiert der Subtyp B.

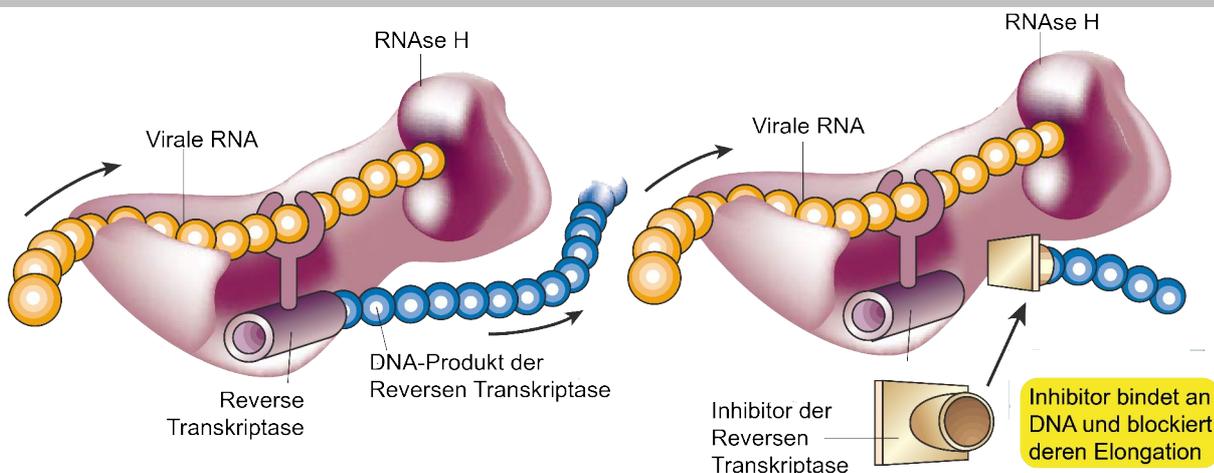
Diese ungewöhnlich hohe Vielfalt verursacht auch erhebliche Schwierigkeiten bei genotypischen Resistenzprognosen (Spira et al. 2003).

2.5.3 REPLIKATIONSZYKLUS UND ANGRIFFSPUNKTE DER PHARMAKOTHERAPIE

Das HI-Virus dockt über CD4 und die Corezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 an periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) an. Für die Bindung ist das auf der Hülle lokalisierte gp120 verantwortlich, während die anschließende Fusion über das transmembrane gp41 vermittelt wird. Diese Vorgänge sind Angriffspunkt der neuesten Klasse von Medikamenten gegen das HI-Virus, den Fusionsinhibitoren (Briz et al. 2006; Poveda et al. 2005). Durch Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran gelangt der Kern (engl. *core*) des Virus mit dem die Erbinformation enthaltenden Kapsid in das Zytosol (engl. *uncoating*). Die reverse Transkriptase (RT) synthetisiert zunächst einen, zur viralen RNA komplementären, DNA-Strang. Als RNase H entfernt sie die ursprüngliche RNA-Matrize vom neu synthetisierten DNA-Strang. Abschließend ergänzt sie in ihrer Eigenschaft als DNA-Polymerase die einsträngige DNA zu einem Doppelstrang. Die RT ist also eine RNA- und gleichzeitig auch DNAabhängige Polymerase mit integrierter RNase Funktionalität.

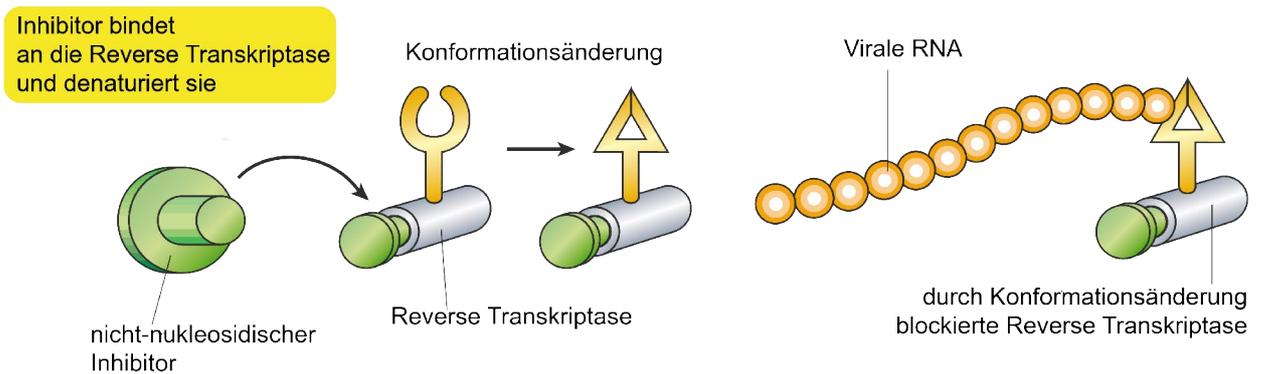
Die Synthese doppelsträngiger Virus-DNA ist Ziel medikamentöser Sabotage. Nukleosidische Inhibitoren der RT (NRTI) provozieren als defekte Nukleosidanaloga Strangabbrüche (Abbildung 2.7), während nicht nukleosidische (NNRTI) direkt das aktive Zentrum angreifen (Richman 2001; Sluis-Cremer et al. 2004) (Abbildung 2.8).

Abbildung 2.7: Mechanismus nukleosidischer Inhibitoren der Reversen Transkriptase



Modifiziert und übersetzt nach einer Darstellung von Richman (Richman 2001). Mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.: *nature*, Copyright (2001). **Abbildung unterliegt NICHT Creative Commons Lizenz.**

²⁵Die gag Sequenz variiert im Vergleich dazu zwischen den Subtypen nur um etwa 15%.

Abbildung 2.8: Mechanismus nicht nukleosidischer Inhibitoren der Reversen Transkriptase

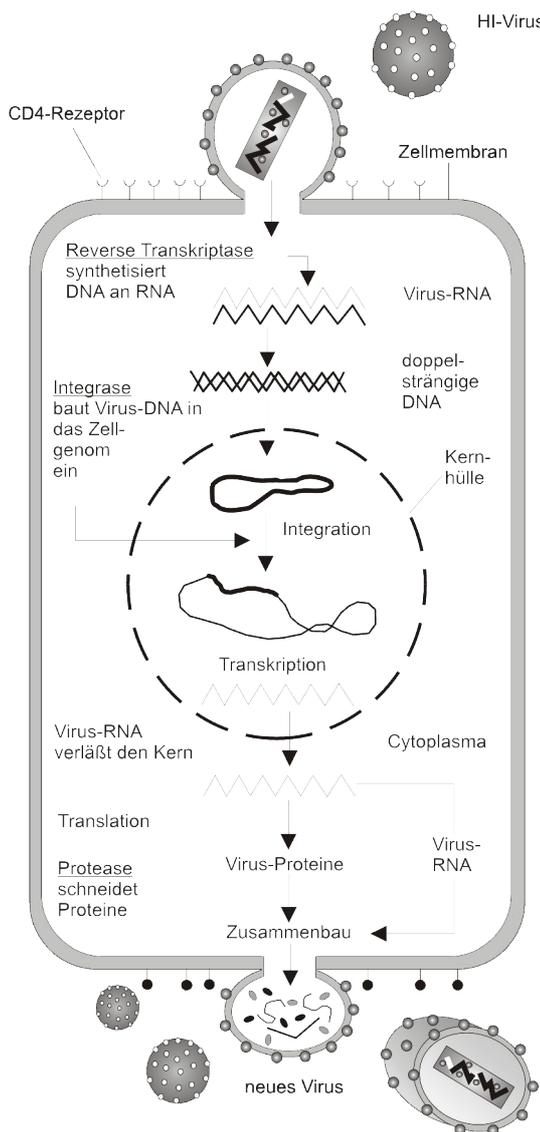
Modifiziert und übersetzt nach einer Darstellung von Richman (Richman 2001). Mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.: *nature*, Copyright (2001). **Abbildung unterliegt NICHT Creative Commons Lizenz.**

Die doppelsträngige Virus-DNA wird in den Zellkern transportiert und von der Integrase an zufälligen Loci ins zelluläre Genom integriert. Ab hier bezeichnet man die virale DNA als *Provirus*. Das Provirus verhält sich im Wesentlichen ähnlich einem zelleigenen Gen. In der proviralen DNA liegt die derzeitige (2006) Unheilbarkeit von AIDS begründet: Die Replikation lässt sich durch die Kombination mehrerer antiretroviraler Wirkstoffe zwar bis unter die Nachweisgrenze drosseln, das Provirus kann jedoch – einmal integriert – nicht mehr entfernt, aber jederzeit reaktiviert werden (Finzi et al. 1997; Hermankova et al. 2003; Pierson et al. 2000; Ruff et al. 2002; Wong et al. 1997). Eine lebenslange Therapie mit Virostatika ist deshalb unumgänglich. Integrase-Inhibitoren befinden sich noch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (De Clercq 2004; Jin et al. 2006; Johnson et al. 2004; Reeves & Piefer 2005).

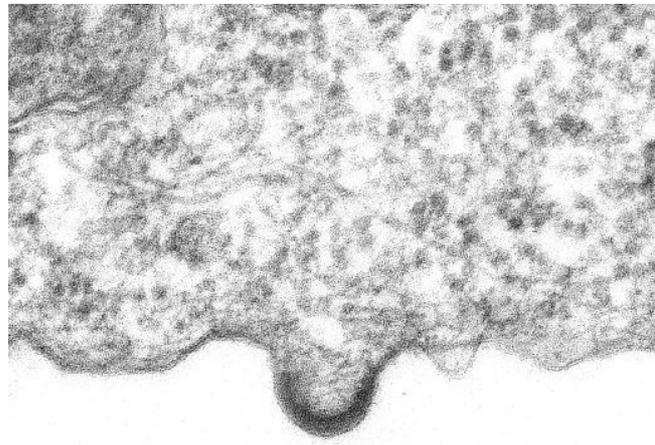
Die Expression des Virusgenoms übernimmt die zelluläre DNA-Polymerase II. Die Transkription beginnt im Bereich der LTRs und ist aus noch unbekanntenen Gründen nur in Anwesenheit von tat effektiv (Dayton et al. 1986; Fisher et al. 1986). Es entstehen über 30 verschiedene RNAs die entweder, wie im Fall der Strukturproteine gag und gag-pol, nicht gespleißt, im Fall von env, vif, vpr und vpr teilweise - oder wie die regulatorischen ORFs rev, tat, und nef - mehrfach gespleißt werden.

Zu den wichtigsten Produkten zählen das gag-Vorläufer-Polypeptid, Pr55^{gag} und das gag-pol-Fusionsprotein Pr160^{gag-pol}. Die noch unreifen Komponenten sammeln sich an der Zellmembran der infizierten Zelle (Resh 2005), wo sie zu neuen Viren assembliert werden (Gottlinger 2001). In einem als Knospung (engl. *budding*) bezeichneten Vorgang werden die Vorläuferproteine mit einer Hülle aus Plasmamembran der Wirtszelle umgeben und kapseln sich ab (Larson et al. 2005; Morita & Sundquist 2004).

Abbildung 2.9: HIV Replikationszyklus



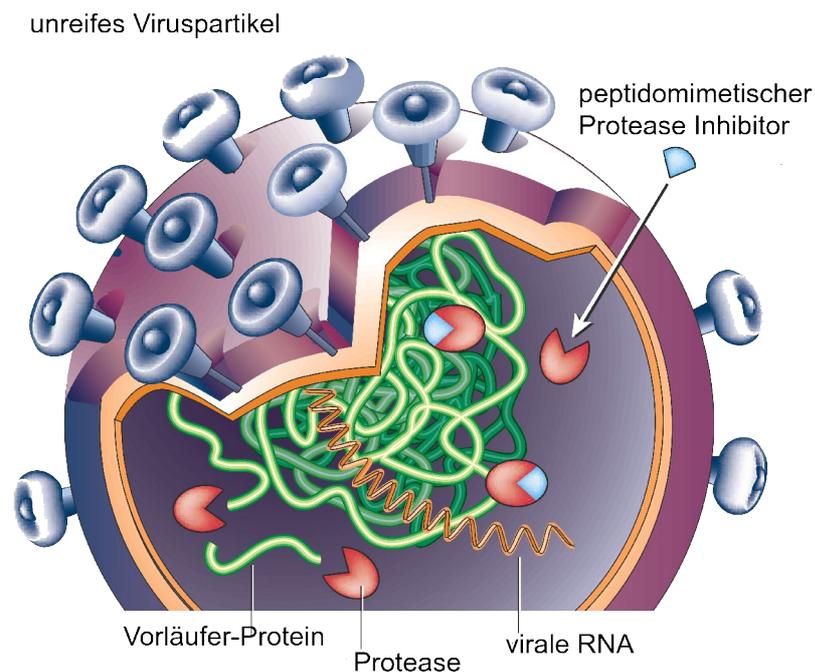
links: schematische Darstellung des HIV Replikationszyklus
 unten: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Ausknospung eines neuen HIV-Partikels (engl. *budding*)



Schema: *Wikimedia Commons* (siehe Fußnote 20 Seite 9); originärer upload am 22. Mai 2004 durch den Autor Daniel Beyer; Ausschnitt Elektronenmikroskopie: Dr. Edwin P. Ewing (1985), CDC; PHIL ID#947

Zu matten HI-Viren werden die Partikel durch die so genannte Reifung. Das gag und das gag-pol-Vorläuferprotein werden von der HIV-Protease mehrfach geschnitten. Die resultierenden Peptidketten falten sich zu den fertigen Proteinprodukten (Freed 2001; Freed & Martin 2001). Die Reifung ist keinesfalls ein optionaler Prozess am Ende der Virusreplikation. Es kommt zu grundlegenden strukturellen Veränderungen, die elektronenmikroskopisch deutlich zu erkennen sind (Yeager et al. 1998).

Vor abgeschlossener Reifung ist das Virus nicht infektiös (von der Helm 1996). Diesen Umstand machen sich die medikamentös eingesetzten Inhibitoren der HIV-Protease zu Nutze.

Abbildung 2.10: Inhibition der HIV-Protease

Nach dem Ausknospen liegt ein unreifes Viruspartikel vor. Damit das Partikel zu einem infektiösen Virus heranreift, ist eine Prozessierung der Vorläuferproteine (engl. *precursors*) durch die virale Protease notwendig. Wird diese Prozessierung medikamentös unterbunden, verbleibt der Viruspartikel im unreifen und damit unschädlichen Zustand.

Modifiziert und übersetzt nach einer Darstellung von Richman (Richman 2001). Mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.: *nature*, copyright (2001). **Abbildung unterliegt NICHT Creative Commons Lizenz.**

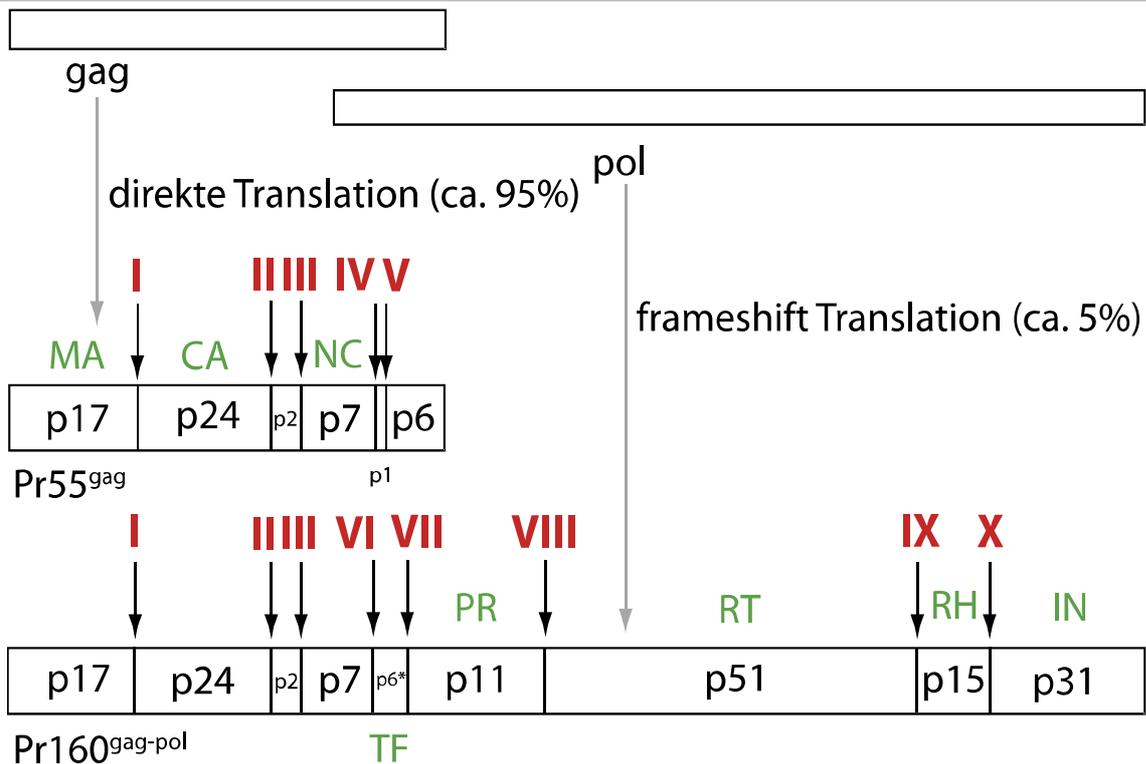
2.6 DIE HIV-PROTEASE

2.6.1 BEDEUTUNG DER PROTEASE FÜR DIE HIV-REPLIKATION

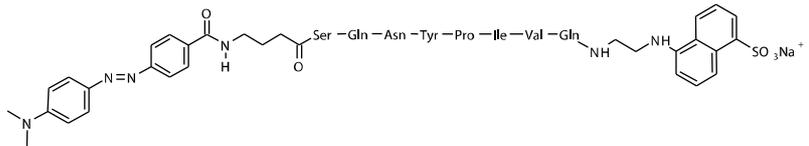
Ohne Protease entstehen lediglich unreife, nicht infektiöse Viruspartikel. Bei einer planmäßigen Reifung schneidet die Protease Pr55^{gag} und Pr160^{gag-pol} an 10 definierten Sequenzen (Kurt et al. 2003) (Abbildung 2.11 Seite 16). Daneben fungieren auch verschiedene zelluläre Proteine als Substrat (Shoeman et al. 1990; Shoeman et al. 1991). Dieses aggressive Verhalten gegenüber Zellbestandteilen trägt zur Toxizität bei, die die Anzucht in *E. coli* erschwert (Baum et al. 1990; Gehring 2001; Gehring et al. 2003). Um aktiv werden zu können, muss auch die Protease selbst aus dem Pr160^{gag-pol} freigesetzt werden. Es wird angenommen, dass dieses durch Autokatalyse geschieht (Louis et al. 1999; Pettit et al. 2004; Philip et al. 1992).

Im Rahmen des am MvP entwickelten phänotypischen Resistenzassays wird ein künstliches Substrat eingesetzt, das der natürlichen Schnittstelle zwischen p17 und p24 in Pr55^{gag} nachempfunden ist (Matayoshi et al. 1990). Diese Schnittstelle gilt als repräsentativ für die Gesamtaktivität (Hoffmann 2002; Hoffmann et al. 2003).

Abbildung 2.11: Bekannte natürliche Schnittstellen der HIV-Protease



oben: die natürlichen Schnittstellen der HIV-Protease
 rechts: das künstliche Substrat ist der Schnittstelle I nachempfunden. (Matayoshi et al. 1990)



Modifiziert nach Darstellungen von Eberle, Chiu, Pettit, de Oliveira, Beck, Tomasselli und Matayoshi (Beck et al. 2002; Chiu et al. 2006; Eberle 2006; Matayoshi et al. 1990; Pettit et al. 2004; Pettit et al. 2005; Tomasselli & Henrikson 2000; de Oliveira et al. 2003); von de Oliveira werden 2 weitere Schnittstellen berichtet (de Oliveira et al. 2003).

Tabelle 2.2: Bekannte natürliche Schnittstellen der HIV-Protease

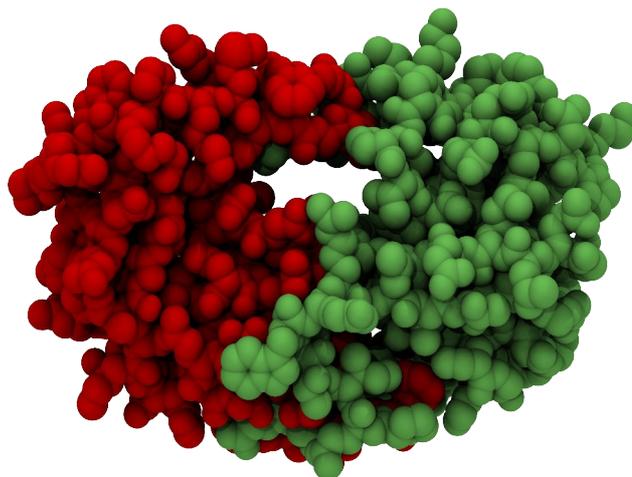
korrespond. Nr. Abbildung 2.11	Ablauf	Spaltstelle		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
		Struktur	Fragment								
I	2	MA-CA	p17-p24	S	Q	N	Y	P	I	V	Q
II		CA-p2	p24-p2	A	R	V	L	A	E	A	M
III	1	p2-NC	p2-p7	T	A	I	M	M	Q	K	G
IV		NC-p1	p7-p1	R	Q	A	N	F	L	G	K
V			p1-p6	P	G	N	F	L	Q	S	R
VI	4	NC-TF _{F440}	p7-p6* _{F440}	R	Q	A	N	F	L	R	E
VII	4	TF _{L441} -PR	p6* _{L441} -p11	S	F	S	F	P	Q	I	T
VIII	5	PR-RT	p11-p51	T	L	N	F	P	I	S	P
IX	3	RT-RH	p51-p15	A	E	T	F	Y	V	D	G
X	2	RH-IN	p15-p31	R	K	V	L	F	L	D	G

Modifiziert nach de Oliveira und Kurt (Kurt et al. 2003; de Oliveira et al. 2003). Aminosäuresequenz variiert je nach Autor bzw. Subtyp. Angaben hier nach de Oliveira, der auch subtypspezifische Variationen aufführt (de Oliveira et al. 2003). Nomenklatur der Proteine nach der von Leis vorgeschlagenen Klassifikation (Leis et al. 1988). Ablauf der Proteolyse gemäß Pettit (Pettit et al. 2005). Buchstabencode der Aminosäuren im Anhang. P4' N-terminal positioniert. Rote Linie markiert Schnittstelle.

2.6.2 BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN UND STRUKTUR DER HIV-PROTEASE

Bei der HIV-Protease (PR) handelt es sich um ein Homodimer aus der Familie der Aspartatproteasen (Dunn et al. 2002; Seelmeier et al. 1988). Die relativ kleine Gruppe der Aspartatproteasen ist keineswegs nur in Retroviren vertreten, sondern gehört auch zum Repertoire zahlreicher humaner Stoffwechselfvorgänge: Prominente Vertreter sind Renin, Cathepsin D, Gastricin und Pepsin (Dash et al. 2003; Hoegl et al. 1999; Neurath 1986). Das macht Aspartatproteasen zum Angriffsziel von Medikamenten gegen so unterschiedliche Erkrankungen wie Hypertonie, Malaria und AIDS.

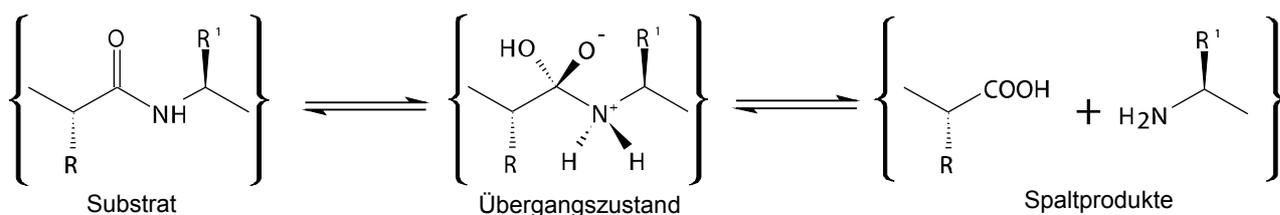
Abbildung 2.12: Raumstruktur der HIV-Protease



Die Grafik wurde mit VMD²⁶ (Humphrey et al. 1996) unter Verwendung des *Protein Data Bank*²⁷ (PDB) (Berman et al. 2000) Strukturdatensatzes 7hvp (Swain et al. 1990) und des in VMD integrierten Ray Tracing Systems *Tachyon*²⁶ von John Stone erzeugt. Jedes Monomer ist in einheitlicher Farbe dargestellt.

Im Fall der HIV-Protease lagern sich zwei identische Monomere von nur 99 Aminosäuren **nicht** kovalent zum Holoenzym zusammen. Hierbei scheint ein Gerüst aus Wasserstoffbindungen (engl. *fireman's grip*) einen entscheidenden Beitrag zu leisten (Ingr et al. 2003; Strisovsky et al. 2000). Jedes Monomer steuert zur prosthetischen Gruppe im Zentrum des Moleküls ein Asp-Tyr-Gly-Motiv bei (Katz & Skalka 1994; Navia et al. 1989; Weber et al. 1989). Substrate binden in dieser als *binding cleft* bezeichneten Formation. Das verursacht via Konformationsänderungen ein „Herunterklappen“ der darüber liegenden Proteinschleifen (engl. *flaps*) (Davies 1990). Die Amidbindung des Substrates wird durch Addition eines Wasserstoffmoleküls hydrolysiert.

Abbildung 2.13: Prinzip der hydrolytischen Spaltung der HIV PR



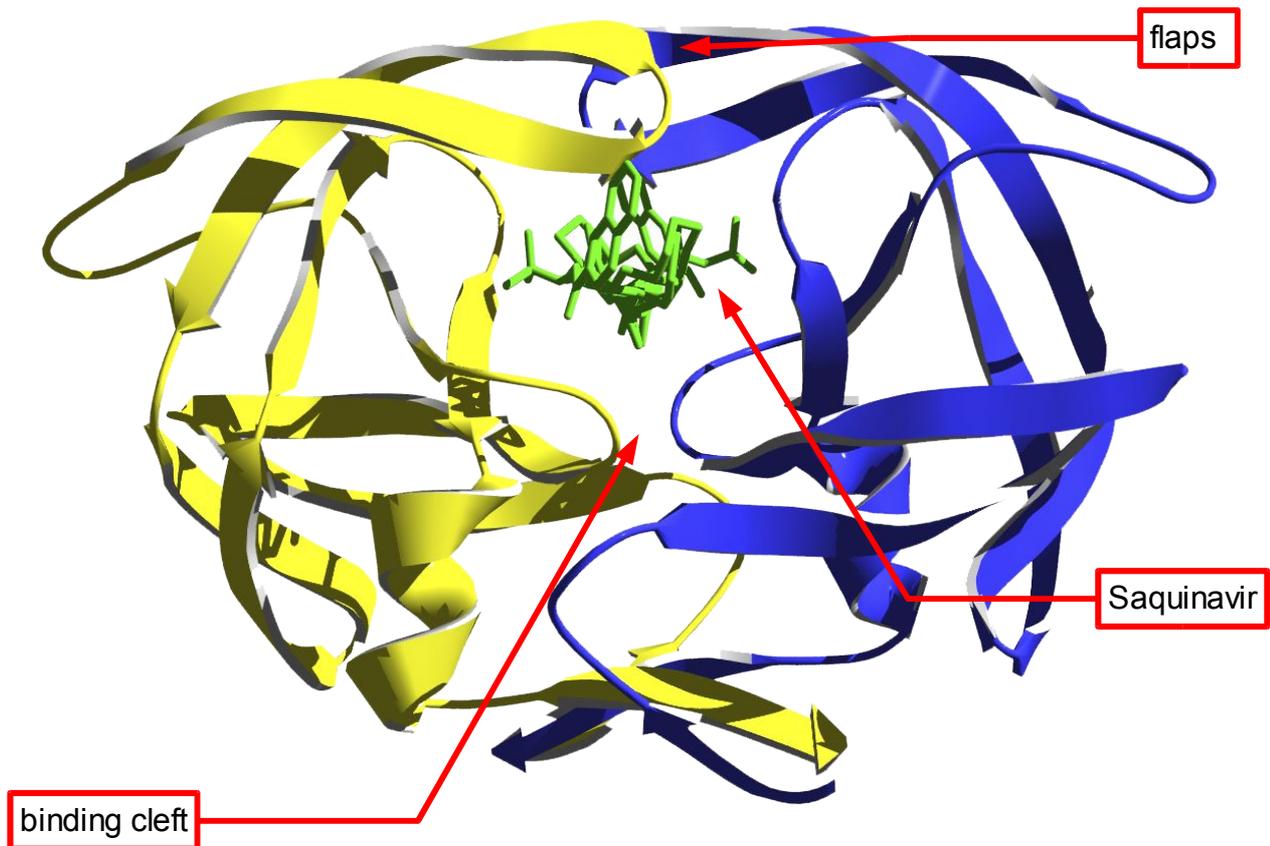
Nach einer Darstellung von Eberle (Eberle 2006).

²⁶*Visual Molecular Dynamics* (VMD), Programm zur Darstellung und Analyse von Makromolekülen (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>); *Tachyon* Ray Tracing System: <http://jedi.ks.uiuc.edu/~johns/raytracer/>

²⁷*Protein Data Bank* (PDB), internationale Datenbank für die Struktur von Makromolekülen. (<http://www.pdb.org>)

Die HIV-PR ist ein hydrophobes Protein. Das pH-Optimum liegt bei 4,5-6,5 (Billich & Winkler 1990; Matayoshi et al. 1990). Hydrophobizität und Toxizität sind wahrscheinliche Ursachen der Bildung von Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*) bei der rekombinanten Herstellung in *E. coli* (Gehring 2001; Gehring et al. 2003). Diese *inclusion bodies* müssen bei der Präparation von aktiver PR durch Ultraschall dispergiert werden. Das niedrige pH-Optimum und die ungewöhnliche Robustheit gegenüber saurem Milieu werden im Rahmen des am MvP entwickelten Resistenztests zur Aufreinigung genutzt: Während die PR eine Titration auf einen pH-Wert von 2 übersteht, werden nahezu alle anderen Proteine denaturiert.

Abbildung 2.14: Struktur der HIV-Protease



HIV-1 Protease mit komplexiertem Inhibitor Saquinavir in einer *Ribbon*-Darstellung²⁸. Generiert aus den PDB Strukturdaten 1hxb (Krohn et al. 1991). Die Graphik wurde mit *DeepView* - *Swiss-PdbViewer*²⁹ (Guex & Peitsch 1997) und *POV-Ray*³⁰ generiert. Jedes Monomer ist in einheitlicher Farbe dargestellt.

2.6.3 PROTEASEINHIBITOREN

In Hoch-Durchsatz-Analysen (engl. *high throughput analysis*) wurden Anfang der 1990er Jahre zahlreiche Substanzen hinsichtlich ihres hemmenden Einflusses auf die HIV-Protease gescreent. Dabei ging man von der bereits bekannten Struktur der Inhibitoren des Renins aus, das ebenfalls eine Aspartyl-Protease ist (Tomasselli & Heinrikson 2000).

²⁸engl. *ribbon* deut. Band

²⁹*DeepView* - *Swiss-PdbViewer*, freie Software zur Darstellung von Makromolekülen. (<http://www.expasy.org/spdbv>)

³⁰*POV-Ray*, freies Programm zur Strahlenverfolgung (engl. *raytracing*). (<http://www.povray.org>)

Mit Hilfe von computergestützter Modellierung (engl. *computer aided drug design*, CADD) wurden die in den Hoch-Durchsatz-Analysen entdeckten Ausgangsverbindungen (engl. *leads*) systematisch zu den heute medikamentös eingesetzten Inhibitoren weiterentwickelt. Weil sie die natürlichen HIV-Proteinsequenzen nachahmen, heißen sie auch peptidomimetische Inhibitoren. Im Unterschied zu ihren Vorbildern können sie allerdings nicht gespalten werden. Das aktive Zentrum der Protease wird blockiert. Die Inhibitoren konkurrieren mit dem natürlichen Substrat um das aktive Zentrum, sind also kompetitiv.

Trotz ihrer schlechten Bioverfügbarkeit eignen sie sich für die orale Applikation (Vierling & Greiner 2003), da sie Ihre Wirkung bereits in subnanomolaren Konzentration entfalten (von der Helm 1996).

Abbildung 2.15: Peptidomimetische Proteaseinhibitoren

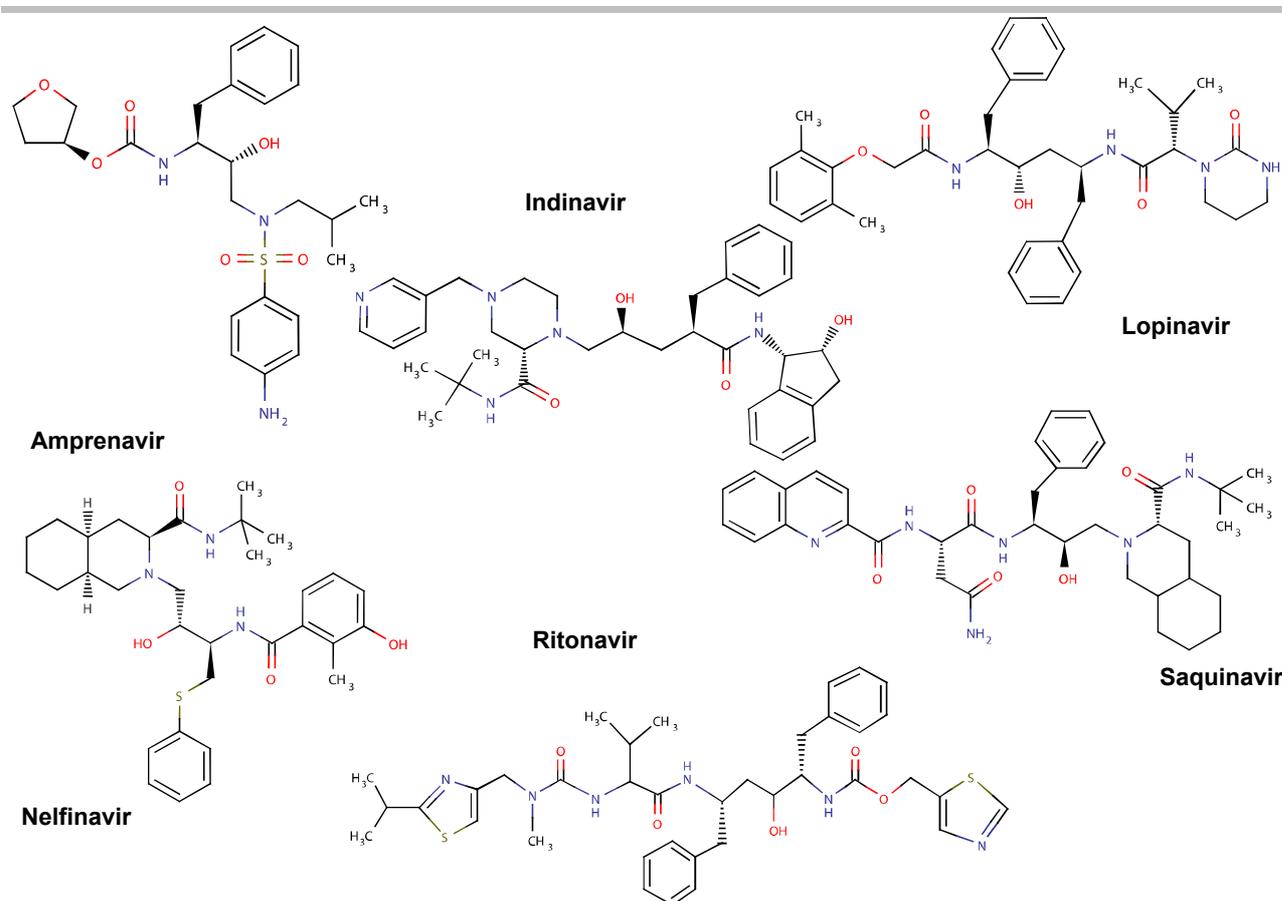


Abbildung modifiziert nach Darstellungen von Randolph und Tomasselli (Randolph & DeGoey 2004; Tomasselli & Henrikson 2000). Die Strukturdaten wurden über *ChemIDplus Advanced*³¹ der SIS³² der NLM³³ mit Hilfe des Javaapplets *Marvin* (Hersteller ist ChemAxon®) bezogen.

³¹Umfangreiche Datenbank zu chemischen Substanzen mit dem Schwerpunkt auf medizinischen Wirkstoffen. Teil der *Specialized Information Services* der NLM (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

³²*Specialized Information Services* der *National Library of Medicine*, USA (<http://sis.nlm.nih.gov>)

³³*National Library of Medicine* der *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA (<http://www.nlm.nih.gov/>)

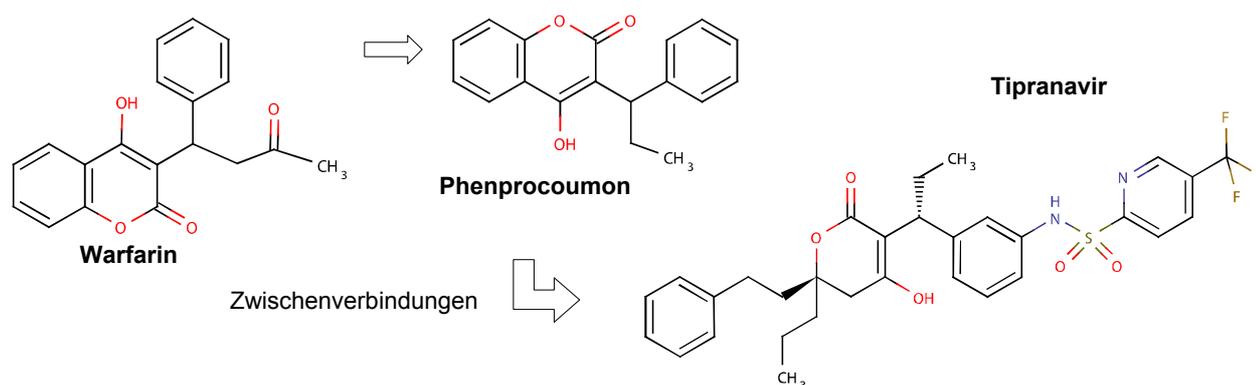
Tabelle 2.3: Proteaseinhibitoren

Trivialname	Kürzel	Summenformel	CAS Registry Number ³⁴	MW	Firma
Amprenavir	APV	C ₂₅ -H ₃₅ -N ₃ -O ₆ -S	161814-49-9	505.633	Vertex und Glaxo Wellcome
Indinavir	IDV	C ₃₆ -H ₄₇ -N ₅ -O ₄	150378-17-9	613.798	Merck
Lopinavir	LPV	C ₃₇ -H ₄₈ -N ₄ -O ₅	192725-17-0	628.809	Abbott
Nelfinavir	NFV	C ₃₂ -H ₄₅ -N ₃ -O ₄ -S	159989-64-7	567.791	Agouron
Ritonavir	RTV	C ₃₇ -H ₄₈ -N ₆ -O ₅ -S ₂	155213-67-5	720.955	Abbott
Saquinavir	SQV	C ₃₈ -H ₅₀ -N ₆ -O ₅	127779-20-8	670.85	Roche

Angaben gemäß *ChemIDplus Advanced* (siehe Fußnote 31 Seite 19).

Unterdessen wurden auch nicht peptidomimetische Inhibitoren der HIV-PR entwickelt (Chearskul et al. 2006). Man hatte die Vitamin-K-Antagonisten Warfarin und Phenprocoumon als Hemmstoffe der HIV-PR identifiziert (Tomasselli & Heinrikson 2000; Tomich et al. 1994). Überraschend ist, dass Cumarine gleichzeitig auch die RT und sogar die IN zu inhibieren scheinen (Kostova 2006). Am Ende einer schrittweisen Verfeinerung (Abbildung 2.16) steht Tipranavir (TPV; Aptvirus®) als erster zugelassener nicht peptidomimetischer Inhibitor der PR. Das Medikament stellte seine Wirksamkeit bei gegenüber herkömmlichen Inhibitoren resistenten Viren unter Beweis (Larder et al. 2000) und verspricht ein milderer Nebenwirkungsprofil. Es ist wohl jedoch nur eine Frage der Zeit, bis auch diese neue Klasse von PR-Inhibitoren durch Resistenzbildung an Wirksamkeit einbüßt (Baxter et al. 2006).

Abbildung 2.16: Systematische struktur-basierte Entwicklung von Inhibitoren: Tipranavir



Darstellung modifiziert und verkürzt nach Tomasselli (Tomasselli & Heinrikson 2000). Die Strukturdaten wurden über *ChemIDplus Advanced* der SIS der NLM mithilfe des Javaapplets *Marvin* (Hersteller ist ChemAxon®) bezogen.

2.6.4 PR-INHIBITOREN ALS ZENTRALER BESTANDTEIL DER PHARMAKOTHERAPIE

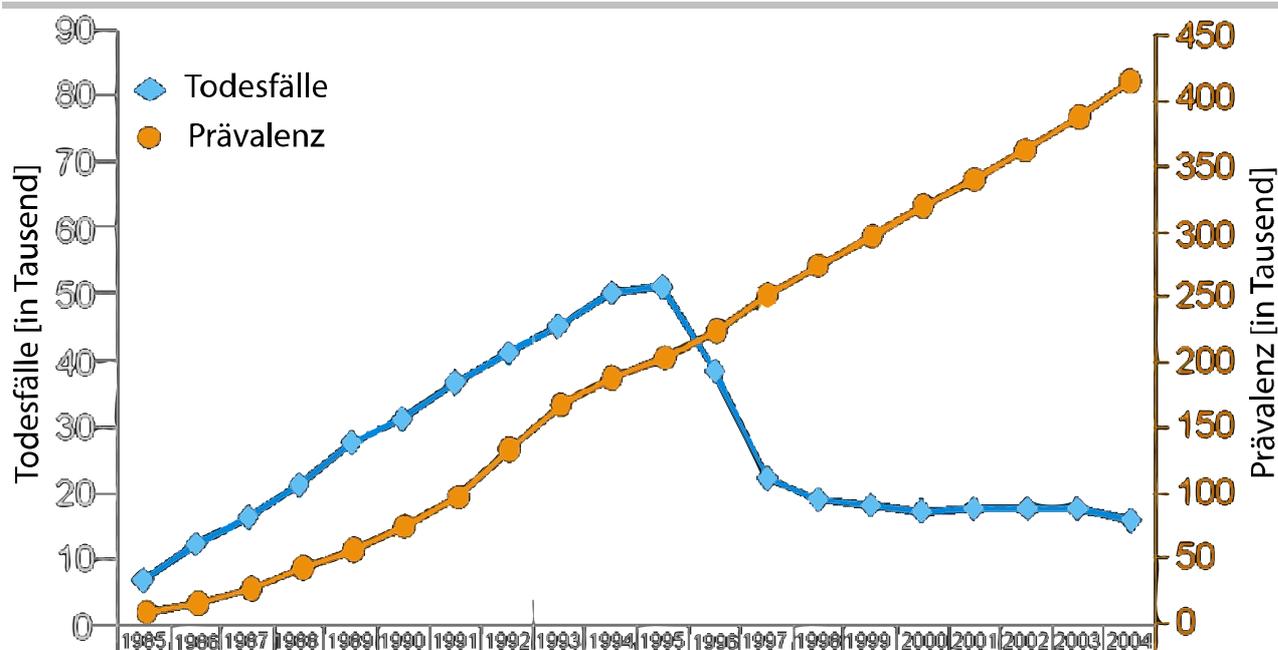
Insgesamt sind augenblicklich 5 verschiedene Klassen antiretroviraler Medikamente in klinischer Anwendung:

³⁴Die CAS-Nummer (engl. CAS Registry Number, CAS = *Chemical Abstracts Service*) ist ein internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe.

- nukleosidische (NRTI) und
- nicht nukleosidische (NNRTI) RT-Inhibitoren
- peptidomimetische und
- nicht peptidomimetische PR-Inhibitoren
- Fusionsinhibitoren.

Die Kombinationsbehandlung mit mehreren verschiedenen Klassen wird als *highly active antiretroviral therapy* (HAART) bezeichnet. Die Zahl der Todesfälle und AIDS-Erkrankungen reduzierte sich seit Verfügbarkeit der HAART deutlich (Abbildung 2.17). In vielen Fällen gelingt es, die Virusreplikation bis unter die Nachweisgrenze³⁵ zu reduzieren. Die Zahl der CD4-positiven Zellen stabilisiert sich im Bereich normaler Werte (Gulick et al. 2000). Die Betroffenen können ein weitgehend normales Leben führen. Dabei dürfen allerdings Nebenwirkungen, wie z.B. die Lipodystrophie, nicht verschwiegen werden.

Abbildung 2.17: AIDS Epidemiologie in den USA 1985-2004



Modifiziert und übersetzt nach einer Grafik aus einer PowerPoint³⁶-Präsentation der Centers of Diseases Control, Atlanta, USA. Download über die Website <http://www.cdc.gov>, 2006.

Hauptkomplikation der lebenslangen Therapie mit Proteaseinhibitoren ist, abgesehen von medikamentösen Nebenwirkungen, die Entstehung von Resistenzen. Erfahrungen zu einer über den Zeitraum von gut 10 Jahren hinausgehenden Behandlung liegen bisher nicht vor.

2.6.5 RESISTENZEN DER HIV-PROTEASE

Zur Ausbildung von Resistenzen bei HI-Viren tragen eine Reihe unterschiedlicher Faktoren bei:

³⁵Die Nachweisgrenze von HIV RNA liegt bei etwa 50 Genomäquivalenten/ml (Johanson et al. 2001)

³⁶PowerPoint ist ein proprietäres Präsentationsprogramm der Firma Microsoft®.

- Fehlende Compliance bzw. interindividuelle Unterschiede³⁷ in der Pharmakodynamik³⁸ (Khoo et al. 2002) während der HAART. Dieses Problem ist in den von HIV-Infektionen stark betroffenen Entwicklungsländern bei fehlender ärztlicher Betreuung und Aufklärung besonders ausgeprägt (Brugha 2003).
- Die Notwendigkeit einer lebenslangen Therapie räumt der Resistenzentwicklung viel Raum ein.
- Große Mutationsfrequenz der HI-Viren (Drosopoulos et al. 1998) durch fehlende Proof-Reading-Funktion der RT mit einer konsekutiven Mutationsrate von ca. 3×10^{-5} je Replikationszyklus (Keulen et al. 1997; Mansky & Temin 1995). Roberts beziffert die Fehlerquote der RT auf durchschnittlich 1/1700 Nukleotide³⁹ (Roberts et al. 1988).
- Hohe Zahl an freigesetzten Viren (ca. 10^{10} Viren/die) auch während der asymptomatischen Infektionsphase. Die zelluläre Infektionsrate wird auf 10^9 Zellen täglich geschätzt (Coffin 1995; Lal et al. 2005; Stellbrink et al. 1997).

Das hat nach einer Berechnung von Coffin (Coffin 1995) zur Folge, dass jede denkbare Punktmutation entlang des viralen Genoms mit einer Frequenz von 10^4 bis 10^5 täglich auftritt. Resistenzentwicklung ist also im wahrsten Sinne des Wortes ein alltägliches Problem.

Trotz der kurzen Proteinsequenz von nur 99 Aminosäuren sind Mutationen an fast der Hälfte aller Positionen mit einer Virusreplikation vereinbar und mit Resistenzen assoziiert.

Tabelle 2.4: Mutationen der HIV-Protease

	L		V		M	I	I	I		G		I	L			
Amprenavir	10		32		46	47	50	54		73		84	90			
	F		I		I	V	V	L		S		V	M			
	I				L			V								
	R							M								
	V															
	L	K	L	V	M	M		I	A	G	V	V	I	L		
Indinavir	10	20	24	32	36	46		54	71	73	77	82	84	90		
	I	M	I	I	I	I		V	V	S	I	A	V	M		
	R	R				L			T	A		F				
	V											T				
	L	K	L	V	L	M	I	I	F	I	A	G	V	I	L	
Lopinavir/Ritonavir	10	20	24	32	33	46	47	50	53	54	63	71	73	82	84	90
	F	M	I	I	F	I	V	V	L	V	P	V	S	A	V	M
	I	R				L	A			L		T		F		
	R									A				T		
	V									M				S		
										T						
										S						

³⁷Eine Übersicht der Determinanten des Wirtes bei HIV Infektionen findet sich bei Hogan und Hammer (Hogan & Hammer 2001a; Hogan & Hammer 2001b)

³⁸Unterschiede in der Pharmakodynamik werden unter anderem auch durch zelluläre Mechanismen wie die *multi drug transporter*-Familie verursacht (Lee et al. 1998).

³⁹Die maximale Fehlerquote in *mutational hotspots* lag bei 1 je 70 polymerisierter Nukleotide. Die HIV RT ist damit einer der fehlerträchtigsten reversen Transkriptasen. Die Polymerase des Murinen Leukämie Virus – ebenfalls ein Retrovirus – (NCBI Taxonomy ID: 11786) ist zum Vergleich mit Fehlerraten um 1/30,000 Nukleotide behaftet (Roberts et al. 1988).

	L		D		M	M			A	V	V	I	N	L
Nelfinavir	10		30		36	46			71	77	82	84	88	90
	F		N		I	I			V	I	A	V	D	M
	I					L			T		F		S	
											T			
											S			
	L	K		V	L	M	M		I	A	V	V	I	L
Ritonavir	10	20		32	33	36	46		54	71	77	82	84	90
	F	M		I	F	I	I		V	V	I	A	V	M
	I	R					L		L	T		F		
	R											T		
	V											S		
	L							G	I	A	G	V	V	I
Saquinavir	10							48	54	71	73	77	82	84
	I							V	V	V	S	I	A	V
	R								L	T				M
	V													

Modifiziert nach Johnson (Johnson et al. 2005). Aminosäurecode siehe Anhang. Zahl in grauem Balken gibt Aminosäureposition an. Buchstaben darüber Aminosäuren des Wildtyps, darunter Mutationen. Wichtige Mutationen fett.

Die hohe Mutationsrate führt zur Bildung so genannter Quasispezies (Berkhout 1999; Domingo et al. 1997), gleichzeitig vorhandenen Varianten eines ursprünglich infizierenden Virus innerhalb desselben Wirtes. Da die Replikationsrate auch unter einer effektiven Therapie nicht vollständig zum Erliegen kommt (Gunthard et al. 1998b; Hermankova et al. 2003; Wong et al. 1997), entsteht ein Selektionsvorteil für resistente Mutanten (Ridky & Leis 1995; Rose et al. 1996). Gewinnt der Anteil resistenter Viren die Oberhand, versagt die HAART, was als Anstieg der Viruslast⁴⁰ imponiert. Resistenztestungen bilden in diesem Fall die rationale Grundlage einer gezielten Umstellung der virostatischen Therapie.

In einer Untersuchung von über 6000 zur Resistenztestung eingesandten Proben lag der Anteil gegen Proteaseinhibitoren resistenter Viren je nach Inhibitor zwischen 17 % und 25 %. Innerhalb der resistenten Gruppe fanden sich bei 59 % - 80 % Kreuzresistenzen (Hertogs et al. 2000).

Die Prävalenz von Resistenzen liegt aber auch schon unter unbehandelten Infizierten in Europa bei 10 %⁴¹ (Wensing et al. 2003). Studien in den USA kamen zu einem sehr ähnlichen Ergebnis (Novak et al. 2005; Shafer 2002). Für Viren des Subtyps Non-B⁴² stieg die Prävalenz von Resistenzen bei Erstdiagnose von 2,0 % im Zeitraum 1996-1998 auf 8,2 % im Zeitraum 2000-2001 an (Wensing et al. 2003). In der Konsequenz erscheinen Resistenztestungen heute schon zu Beginn der Behandlung sinnvoll.

2.7 RESISTENZTESTUNG

Die Evidenz des therapeutischen Nutzens von Resistenztestungen ist zwar umstritten (Dunn et al. 2004; Flexner 2000; Meynard et al. 2002; Price et al. 2002), wurde in retrospektiven und prospekti-

⁴⁰Anzahl der Genomäquivalente/ml

⁴¹kürzlich Infizierte 13,5%, chronisch Infizierte 8,7%, p=0,006 (Wensing et al. 2003)

⁴²Anteil von ca. 30% am untersuchten Kollektiv (Wensing et al. 2003)

ven Studien aber immer wieder belegt (Baxter et al. 2000; Cohen et al. 2002; Haubrich & Demeter 2001; Sarmati et al. 2004; Tural et al. 2002⁴³; Durant et al. 1999)⁴⁴ und ist Bestandteil zahlreicher Therapieempfehlungen (u.a. IAS-USA⁴⁵, DHHS⁴⁶, EuroGuidelines⁴⁷). Die Indikation zur Resistenztestung wird von den Fachgesellschaften unterschiedlich gesehen.

Tabelle 2.5: Indikationen einer Resistenztestung

Fall	IAS-USA	DHHS	EuroGuidelines
Frische HIV-1 Infektion	Testung in Erwägung ziehen, um Übertragung resistenter Viren zu erkennen. Therapie auf maximale Wirkung optimieren. Die Behandlung sollte durch ausstehende Testergebnisse nicht verzögert werden.	Testung in Erwägung ziehen.	Testung sollte insbesondere in Erwägung gezogen werden, wenn die Transmissionsrate hoch ist oder die Übertragung von einem behandelten Individuum angenommen wird. Die Behandlung sollte durch ausstehende Testergebnisse nicht verzögert werden.
Etablierte HIV-1 Infektion in unbehandelten Individuen	Testung in Erwägung ziehen, um früh die Transmission resistenter Viren zu erkennen, auch wenn das mit den derzeitigen Testsystemen nicht in jedem Fall möglich ist.	Testung nicht generell empfohlen, da Prävalenz resistenter Viren ungewiss und derzeitige Testverfahren unterrepräsentierte Quasispezies eventuell nicht detektieren.	Testung in Erwägung ziehen.
Versagen der ersten Therapie	Testung empfehlen. Medikamente, gegenüber denen eine Resistenz besteht, dokumentieren.	Testung empfohlen.	Testung empfohlen.
Mehrfaches Therapieversagen	Testung empfohlen um Anzahl der wirksamen Medikamente zu erhöhen. Medikamente deren Effektivität unwahrscheinlich ist von der Behandlung ausschließen.	Testung empfohlen.	Testung empfohlen.
Suboptimale virale Suppression unter HAART		Testung empfohlen.	
Schwangerschaft	Testung empfohlen, um maternale Behandlung und Prophylaxe des Ungeborenen zu optimieren.		Testung empfohlen, falls Mutter eine messbare Viruslast hat. Testung für infizierte Kinder, die von unter Behandlung geboren wurden, empfohlen.
Postexpositionsprophylaxe (PEP)			Testung empfohlen. Behandlung nicht durch Abwarten der Testergebnisse verzögern. Falls Probe des Überträgers zur Verfügung steht, Therapie des Infizierten entsprechend Testergebnissen anpassen.

Modifiziert nach einer Übersicht von Shafer (Shafer 2002) und Angaben unter <http://www.iasusa.org/>, <http://aidsinfo.nih.gov/> sowie den aktualisierten europäischen Empfehlungen (Vandamme et al. 2004).

Es gibt zwei prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten der Bestimmung von Resistenzen gegenüber retroviralen Therapeutika: genotypische Prognosen und phänotypische Testsysteme.

⁴³GART-Studie (genotypic antiretroviral resistance testing)

⁴⁴VIRADAPT-Studie

⁴⁵IAS-USA, International AIDS Society–USA (<http://www.iasusa.org/>)

⁴⁶Department of Health and Human Services (<http://aidsinfo.nih.gov/>)

⁴⁷EuroGuidelines Group for HIV Resistance (EuroGuidelines Group for HIV Resistance 2001)

2.7.1 PHÄNOTYPISCHE TESTUNG

Bei phänotypischen Verfahren wird die Resistenz experimentell gemessen.

2.7.1.1 ZELLKULTUR BASIERTE ASSAYS

In einem frühen, äußerst aufwändigen und kostspieligen Assay, wurde zunächst Virus aus peripheren mononukleären Zellen (PBMC) von Patienten angezüchtet. Die Replikationsrate dieser Viren, gemessen als quantitative Bestimmung des p24-Antigens (*core antigen*; Viruskapsid) mittels ELISA⁴⁸, wurde anschließend in PBMCs gesunder Spender unter Anwesenheit von Inhibitoren untersucht (Japour et al. 1993). Ein anderes Testsystem basierte auf einem Plaque-Reduktionsassay (Larder et al. 1990).

In größerem Maßstab sind phänotypische Testungen erst seit der Etablierung rekombinanter Verfahren möglich (Demeter & Haubrich 2001). Dabei werden für die *in vitro* Kultur geeignete Wildtyp-Virus-Vektoren eingesetzt, bei welchen die codierende Region der zu prüfenden viralen Komponenten – derzeit Reverse Transkriptase und Protease – deletiert wurden. Diese Regionen werden aus dem zu untersuchenden Patientenmaterial ergänzt und der so komplettierte Vektor in eine Zellkultur transfiziert (Hertogs et al. 1998; Kellam & Larder 1994; Petropoulos et al. 2000). In Anwesenheit aufsteigender Konzentration der medikamentös eingesetzten Inhibitoren wird die Replikationsrate beobachtet und als IC₅₀ bzw. IC₉₀-Wert festgehalten. Der IC₅₀ gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die Replikation auf 50 % abgesunken ist. Aus dem Vergleich mit dem Wildtyp werden Resistenzfaktoren berechnet. Die Replikationsrate wird über ein Luciferase Indikatorgen (Petropoulos et al. 2000) oder über eine automatisierte Bestimmung der Lebensfähigkeit infizierter Zellen⁴⁹ (Hertogs et al. 1998) gemessen.

Aktuell werden phänotypische Resistenztestungen für die Reverse Transkriptase und Protease unter dem Namen Antivirogram™ (Virco®, Mechelen, Belgien⁵⁰), PhenoSense™ (ViroLogic®, San Francisco, USA) und Phenoscript™ (VIRalliance®, Paris, Frankreich⁵¹) kommerziell angeboten.

2.7.1.2 ENZYMKINETISCHE ASSAYS

Enzymkinetische Assays messen isoliert die Aktivität eines viralen Enzyms *in vitro*. Die Reverse Transkriptase ist wegen ihres technisch gut zu quantifizierenden Syntheseprodukts DNA hierfür prinzipiell besonders geeignet. Die Messung gelingt wegen der hohen Sensitivität, mit der sich DNA via PCR nachweisen lässt, direkt aus Patientenmaterial (Obermeier 2006). Dennoch ist wegen diverser technischer Probleme kein Testsystem für die Routinediagnostik verfügbar.

⁴⁸enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

⁴⁹engl. *viability assay* (Hertogs et al. 1998)

⁵⁰<http://www.vircolab.com>

⁵¹<http://www.viralliance.com>

Analog zu den zellkulturbasierten Assays werden in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen IC_{50} und IC_{90} ermittelt und mit dem Wildtyp verglichen (Garcia Lerma et al. 1999; Heneine et al. 1995).

Für die HIV-Protease existierten bisher nur wenige Verfahren für Forschungszwecke (Markgren et al. 2000; Nillroth et al. 1997; Maschera et al. 1995). Der am MvP entwickelte Assay wurde als bisher einziges Testsystem für den klinischen Einsatz in der Routinediagnostik konzipiert (Gehring 2001; Gehring et al. 2003; Hoffmann 2002; Hoffmann et al. 2003; Hoffmann et al. 2005). Nach rekombinanter Herstellung der HIV-Protease in *E. coli*, bzw. einem in vitro Translationssystem, wird die Enzymaktivität in einem Fluoreszenzassay mithilfe eines künstlichen Substrates gemessen.

2.7.2 GENOTYPISCHE RESISTENZPROGNOSEN

Anders als der weit verbreitete Begriff „genotypische Resistenztestung“ suggeriert, handelt es sich im Unterschied zu phänotypischen Assays nicht um eine Testung im eigentlichen Sinn, sondern um eine Resistenzprognose auf Grundlage des Mutationsprofils eines Virus.

2.7.2.1 REGEL-BASIERTE PROGNOSEN

Das Genom der Reversen Transkriptase und Protease wird sequenziert und auf Mutationen untersucht. Das Mutationsmuster wird durch regel-basierte Algorithmen (z. B. ANRS⁵², HIVdb⁵³, Rega⁵⁴) klassifiziert. Diese Algorithmen stützen sich auf Forschungsergebnisse, statistische Erkenntnisse aus Datenbanken und Expertenerfahrung.

In Deutschland wird derzeit im Rahmen des HIV-GRADE-Projektes (**Genotypischer Resistenz Algorithmus DE**utschland) ein eigener Algorithmus entwickelt. Das Verfahren ist noch unveröffentlicht. Unter www.hiv-grade.de kann man aber schon jetzt Protease-Sequenzen interpretieren lassen. Parallel werden Prognosen auf Basis der drei oben genannten Algorithmen erstellt, so dass die Ergebnisse komfortabel verglichen werden können.

2.7.2.2 REIN DATENBANK-BASIERTE SYSTEME: VIRTUAL PHENOTYPE

Als *Virtual Phenotype* bezeichnet die Firma Virco® ihre kostenpflichtige genotypische Resistenzprognose, die auf der firmeneigenen, nicht öffentlichen, Resistenzdatenbank mit etwa 30000⁵⁵, nicht redundanten, Genotyp-Phänotyp-Korrelationen⁵⁶ aufbaut. Die phänotypischen Daten entstammen dem firmeneigenen, ebenfalls kommerziell angebotenen, Assay. Im Gegensatz zu den

⁵²Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/36_vih_2.htm). SIDA (*Syndrome d'Immuno-Déficience Acquis*e) ist der im französischen Sprachraum übliche Begriff für AIDS.

⁵³HIV Drug Resistance Database (Shafer et al. 2000) der Stanford University, USA (<http://hivdb.stanford.edu>)

⁵⁴Algorithmus des Rega-Institutes der Universität Leuven, Belgien (Van Laethem et al. 2002). Regel-basiert auf dem Befundungsverfahren eines einzelnen Experten.

⁵⁵Angabe gemäß Firmenhomepage (<http://www.vicolab.com>), Stand 2006

⁵⁶Die Datenbank wurde nach Angaben von Virco® aus ca. 100000 Messungen extrahiert.

oben erwähnten regel-basierten Methoden, entsteht der Befund durch Zuordnung des jeweiligen phänotypischen Datensatzes zu den einzelnen Mutationen und anschließende Mittelung der Ergebnisse, nach einem nicht publizierten Verfahren.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt das freie Interpretationssystem *geno2pheno* (Beerenwinkel et al. 2003a)⁵⁷. Dem Algorithmus liegt eine Datenbank von 650 ausgewählten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu Grunde⁵⁸. Resistenzprofile werden mittels komplexer Bioinformatik-Methoden des statistischen Lernens (Beerenwinkel 2003; Beerenwinkel et al. 2003b), wie u.a. Vektor-Maschinen (Beerenwinkel et al. 2002c) und Entscheidungsbäumen berechnet. Als Ergebnis wird, wie bei phänotypischen Assays, ein Resistenzfaktor angegeben. Die Prognosen erwiesen sich zumindest hinsichtlich der kurzfristigen viralen Reaktion als prädiktiv (Beerenwinkel et al. 2002b). Das über eine Webseite⁵⁷ verfügbare Interpretationssystem wurde seit seiner Veröffentlichung im Dezember 2000 bereits über 45000 mal in Anspruch genommen.

2.7.2.3 STRUKTUR-BASIERTE PHÄNOTYPISIERUNG

In den letzten Jahren gab es darüber hinaus Versuche, Resistenzen mit strukturellen bzw. thermodynamischen Computersimulationen vorherzusagen. Jenwitheesuk erreichte mit einer kombinierten Simulation des Bindungsverhaltens und der molekularen Dynamik für 5 von 6 untersuchten Proteaseinhibitoren eine Übereinstimmung von 72-83 % mit etablierten wissenschaftlichen genotypischen Methoden (Jenwitheesuk & Samudrala 2005). Shenderovich erzielte bei einer strukturbasierten Berechnung der Bindungsenergien zwischen resistenten Proteasen und Inhibitoren in 92 % bzw. 86 % Kongruenz zu den phänotypischen Ergebnissen von PhenoSenseTM⁵⁹ und AntivirogramTM⁶⁰ (Shenderovich et al. 2003). Beiden Vergleichen wurde allerdings die einfachst mögliche Klassifikation in empfindlich bzw. resistent zu Grunde gelegt.

Ein entscheidender Vorteil dieser noch jungen Systeme ist, dass sie im Gegensatz zu ihren regel- und datenbankbasierten Kollegen, theoretisch auch in der Lage sind, Prognosen bei unbekanntem Resistenzmuster und Wirkstoffen zu erstellen.

2.7.3 GENO- UND PHÄNOTYPISCHE RESISTENZTESTUNG IM VERGLEICH

Genotypische Resistenzanalysen sind mit ca. 500 \$ nur etwa halb so teuer, wie phänotypische (Flexner 2000) und versorgen den behandelten Arzt rascher mit Resultaten, bringen jedoch auch eine Reihe von Problemen mit sich:

⁵⁷<http://www.geno2pheno.org>

⁵⁸Stand 2003 (Beerenwinkel 2003, Beerenwinkel et al. 2003a)

⁵⁹ViroLogic®, San Francisco, USA

⁶⁰Virco®, Mechelen, Belgien

- Genotypische Prognosen reduzieren ihre Aussagen meist auf Klassifikationen⁶¹. Die Resistenzfaktoren phänotypischer Testungen ermöglichen eine wesentlich differenziertere Beurteilung des Resistenzprofils eines Virus.
- Genotypische Verfahren neigen dazu, den Resistenzgrad zu unterschätzen (Schoorman et al. 2002).
- Marktübliche Experimentsätze für genotypische Testung sind oft nicht in der Lage, Resistenzen von Non-B-Subtypen zuverlässig zu erfassen (Holguin et al. 2003; Jagodzinski et al. 2003; Fontaine et al. 2001). Dafür sind sowohl Probleme bei der Amplifikation (Maes et al. 2004) als auch die theoretische Basis der Testsysteme verantwortlich: Grundlage sind vornehmlich Genotyp-Phänotyp Korrelationen des in Europa dominanten Subtyps B. In den weltweit gesehen am schwersten betroffenen Ländern Afrikas spielt der Subtyp B jedoch zahlenmäßig so gut wie keine Rolle (Anonymous (RKI) 2006).
- Genotypische Testungen sind, gleichwohl sie in der Lage sind Virenstämme mit einem Anteil von nur 10 % am Gesamtpool zu detektieren (Flexner 2000), nicht immer ausreichend sensitiv gegenüber resistenten Quasispecies (Korn et al. 2003; Van Laethem et al. 1999). Auch wenn multiresistente Quasispezies zum Zeitpunkt der Testung womöglich nur eine Minderheit darstellen, sind sie unter dem Selektionsdruck der HAART eine ernsthafte Bedrohung (Flexner 2000). Studien haben zudem ergeben, dass selbst Mutationen, die einen Anteil von 50 % am viralen Pool des Patienten haben, „übersehen“ werden können (Gunthard et al. 1998a; Schoorman et al. 1999).
- Die Ergebnisse der einzelnen Algorithmen divergieren bei der Beurteilung ein und desselben Mutationsprofils teilweise erheblich (De Luca et al. 2003; Kijak et al. 2003; Korn et al. 2003; Ravela et al. 2003; Snoeck et al. 2006; Sturmer et al. 2003b; Sturmer et al. 2003a; Torti et al. 2003). Standards existieren nicht, Testergebnisse unterschiedlicher Verfahren sind deshalb nur schwer zu vergleichen.
- Regel- und datenbankbasierte genotypische Analysen können nur das erkennen, was zuvor mit phänotypischen Assays untersucht wurde. Sie haben deshalb erhebliche Schwierigkeiten bei der Beurteilung neuer bzw. komplexer Mutationsmuster und können nicht bei neuen Medikamenten eingesetzt werden.

Zu den Schwächen phänotypischer Resistenztestung zählen neben – trotz hochgradiger Automatisierung – hohem Kosten- und Zeitaufwand:

- Eine im Vergleich zu genotypischen Analysen schlechte Reproduzierbarkeit.
- Fragwürdige Grenzwerte (Exkurs 1 Seite 29). Bei beiden kommerziell angebotenen Assays wurde der Grenzwert auf das 2,5- bis 4-fache des IC₅₀ festgelegt (Hirsch et al. 2000). Die

⁶¹Klassifikationen sind insbesondere eine Domäne regelbasierter Prognosen. Auf Korrelationsdatenbanken aufbauende Verfahren wie *geno2pheno* geben (zusätzlich) einen kalkulierten Resistenzfaktor an.

Definition der Resistenz von Pneumokokken gegenüber Penicillin ist zum Vergleich als 33facher Anstieg der für eine Inhibition des Wachstums notwendigen Penicillinmenge definiert (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000). Die für eine effektive Inhibition in vivo notwendigen Wirkstoffkonzentrationen der PR-Inhibitoren sind nicht bekannt. Klinisch validierte Grenzwerte existieren nicht (Hirsch et al. 2000). Die klinische Aussagekraft der derzeitigen Grenzwerte muss daher bezweifelt werden (Flexner 2000).

Abschließend seien noch Limitationen erwähnt, die beide Testsysteme betreffen.

- Auch Mutationen außerhalb der codierenden Sequenz haben womöglich einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten (Flexner 2000; Whitehurst et al. 2003), werden verfahrensbedingt jedoch weder bei phänotypischen Assays (rekombinante Verfahren), noch in genotypischen Assays (selektive Amplifikation mittels PCR) berücksichtigt.
- Abgesehen von Resistenzmutationen wird die Wirksamkeit antiretroviraler Wirkstoffe auch durch zelluläre Faktoren beeinflusst. *Multi drug receptor*-Proteine schleusen Medikamente aus der Zelle und erniedrigen so die Wirkkonzentration (Lee et al. 1998). Sie stehen im Verdacht, maßgebliche Ursache interindividueller Unterschiede in der Pharmakodynamik zu sein. Auch diese Effekte werden in Resistenzassays nicht berücksichtigt, wirken sich aber womöglich in ähnlichem Maße wie Resistenzen auf die Wirksamkeit aus.

In der Praxis kommen aus den eingangs erwähnten Kostengründen und schnellerer Durchführbarkeit, vor allem genotypische Prognosen zum Einsatz. Phänotypische Assays sind meist Spezialaufgaben vorbehalten. Dazu zählt die Analyse neuer bzw. noch junger Wirkstoffe, ein unvorteilhafter klinischer Verlauf trotz Therapieumstellung auf Basis einer genotypischen Prognose und widersprüchliche Ergebnisse genotypischer Algorithmen.

Mit der Zunahme vielfachresistenter Viren wird eine Interpretation genotypischer Resistenzmuster immer schwieriger und damit unzuverlässiger. Der Bedarf für kostengünstige und schnelle phänotypische Resistenzassays ist deshalb dringlich. Der am MvP entwickelte phänotypische Resistenzassay der HIV-Protease will diese Lücke schließen.

Exkurs 1: Grenzwerte phänotypischer Assays

Zur leichteren Interpretation der Testergebnisse durch den behandelnden Arzt klassifizieren auch phänotypische Assays die ermittelten Resistenzfaktoren in resistent bzw. empfindlich. Dazu ist die Festlegung von Grenzwerten (engl. *cutoff*) notwendig. Es werden drei Grenzwerte unterschieden:

- Der **analytische/technische Grenzwert** geht auf wiederholte Testung von Wildtypvirus im Labor zurück, ist also gleichzeitig Ausdruck der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse. Er wird für den *Phenosense* von Virologic mit einem 2,5fachen, für das *Antivirogram* von Virco mit einem 4fachen Anstieg der IC_{50} angegeben.
- Da das im Labor gezüchtete Virus nicht zwingend als repräsentativ für den natürlichen Wildtyp gelten kann wurden die IC_{50} Werte von unbehandelten HIV-Patienten untersucht um die cutoffs dem realen Wildtyp von Patienten anzupassen (Harrigan et al. 2001). Diese Grenzwerte werden als **biologische Grenzwerte** bezeichnet.
- Für eine gezielte Behandlung am Aussagekräftigsten wären **klinische Grenzwerte**, die phänotypisch gemessene Daten mit dem Behandlungserfolg korrelieren. Klinische Grenzwerte sind bisher in nennenswerter Zahl nur für den *Phenoscript* Assay (VIRalliance, Paris, Frankreich) verfügbar (Miller et al. 2003).

3 MATERIAL

3.1 GERÄTE

Tabelle 3.1: Geräte

Gerät	Firma
Schüttelgerät Vortex-2-Genie	Bachhofer, Reutlingen
Waage Ohaus Precision Advanced Electronic Balance GT400	Bachhofer, Reutlingen
Pipetten	
Gilson Pipetman	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Eppendorf Pipetten der Serie <i>Reference</i> und <i>Research</i>	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette Research	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research pro 20-300 µl und 50-1000 µl (automatisch)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B incl. SS34 und GSA-Rotor	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Rotixa/KS	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 Mikroliter	Bachhofer, Reutlingen; Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Extraktion, PCR & Sequenzierung	
Sterilbank Laminar Flow BDK	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
UNO II Thermocycler	Biometra, Göttingen
Sequenziergerät ABI PRISM 377A incl. Software	Perkin Elmer, Weiterstadt
Gelelektrophorese	
Power Supply GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Power Supply Power Pack 200	Biorad, München
Mikrowellengerät Micro-Chef FM B 930	Moulinex, Solingen
Agaroseelektrophoresekammern incl. Zubehör	bts, St. Leon-Rot
Geldokumentationsgerät E.A.S.Y. Win 32	Herolab, Wiesloch
Restriktion und Ligation	
Heizblock Grant QBT	Bachhofer, Reutlingen
Brutschrank B10	Memmert, Schwabach
Transformation und Expression	
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, München
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Photometer Ultrospec Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Gerät	Firma
Aufreinigung der HIV-Protease	
pH-Meter ph526	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer Ikamag Reo	Ika Labortechnik, Staufen
Ultraschallgerät Branson Sonifier B-15	Bachofer, Reutlingen
Messung der Enzymaktivität	
Fl600 Fluorescence Reader	Biotek Kontron, Neufahrn
Vaio PCG-Z1XEP Laptop	Sony, Berlin

3.2 SOFTWARE

Tabelle 3.2: Software

Software	Version	Verwendungszweck	Firma
FigureP™		Enzymkinetische Auswertung	Biosoft, Cambridge, GB
SigmaPlot™	8.0	multiple nichtlineare Regressionsanalyse	Systat, Richmond, USA
GraphPad Prism™	4	nicht lineare Regressionsanalyse	Graphpad, San Diego, USA
Vector NTI Advance™	10	diverse Routineaufgaben der Bioinformatik	Invitrogen, Karlsruhe
Sequence Navigator™		Auswertung Sequenzierung	Perkin Elmer, Weiterstadt
EMBOSS		Primer Design, diverse Routineaufgaben	Open Source
Staden Package	2003	Basecalling, multi Sequence Alignment	Open Source

3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
PCR tubes	Perkin Elmer Deutschland, Überlingen
Nunc CryoTubes	Nunc, Wiesbaden
Küvetten für Elektrotransformation	
Gene Pulser Cuvette 0,1 und 0,2 cm gap	Biorad, München
Mikrotiterplatten Fluoreszenzassay	
96 Well Black / Clear Bottom Plate	Corning GmbH, Wiesbaden
Pipettenspitzen	
10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
20-200 µl und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
gestopft, 10, 100, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf

3.4 REAGENTIEN

3.4.1 CHEMIKALIEN

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden Chemikalien der Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich in den Reinheitsstufen rein⁶² bis p. A.⁶³ verwendet. Ausgewählte Stoffe führt folgende Tabelle auf.

Tabelle 3.4: Ausgewählte Chemikalien

Stoff	Hersteller
DMSO	Merck, Darmstadt
NP40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose Seakem LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin (Natriumsalz)	Biomol, Hamburg
Ampuwa bidestilliertes Wasser	Fresenius, Bad Homburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Dithiothreitol	Biomol, Hamburg
Hefeextrakt (Torula yeast)	Difco Laboratories, Detroit, USA

3.4.1.1 LÖSUNGEN UND PUFFER

Tabelle 3.5: Lösungen und Puffer

Lösung bzw. Puffer	Konzentration	Stoff
Gelelektrophorese		
6x <i>Loading Dye</i> :	60 mM	EDTA
	60 % v/v	Glycerin
	0,2 %	Bromphenolblau
TAE-Puffer:	0,04 M	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA
Aufarbeitung Protease		
PBS-Puffer:	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	pH mit HCl auf 7,4 einstellen	

⁶²Gehalt > 97%

⁶³lat. *pro analysi*, deut. für die Analyse; bezeichnet im Allgemeinen den höchsten Reinheitsgrad

Lösung bzw. Puffer	Konzentration	Stoff
NaAc-Lösungen für Aufarbeitung der Protease		
Lösung 1:	50 mM	NaAc pH 5,5
	5 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	15 % (v/v)	Glycerin
Lösung 2:	0,5 M	NaAc pH 5,5
	5 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	15 % (v/v)	Glycerin
2x Assay Puffer:	100 mM	NaAc
	2 mM	EDTA
	5 mM	DTT
	2 M	NaCl
	5 % (v/v)	Glycerin
	pH mit HCl auf 4,7 einstellen	

3.4.1.2 MEDIEN ZUR BAKTERIENANZUCHT

Tabelle 3.6: Medien

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

3. MATERIAL

3.4.2 PROTEINE

3.4.2.1 ENZYME UND PEPTIDE

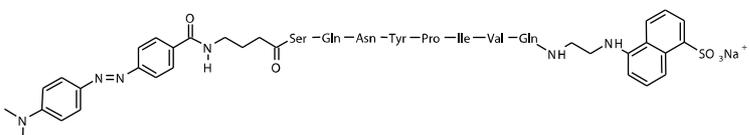
Tabelle 3.7: Enzyme

Enzym bzw. Peptid	Konzentration	Lieferant
Rinderserumalbumin (BSA)		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polymerasen		
AmpliTaqGold-Polymerase	5 U/μl	Perkin Elmer, Weiterstadt
AmpliTaq-Polymerase	5 U/μl	Perkin Elmer, Weiterstadt
Reverse Transkriptase (RT) SuperScript II RnaseH ⁻	200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
katabole Enzyme		
Benzonase	25 U/μl	Merck, Darmstadt
Lysozym	20 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Restriktionsenzyme		
HindIII	REBASE ⁶⁴ Enz Num 1151 A*AGCTT	40 U/μl Roche, Mannheim
BamHI	REBASE ⁶⁴ Enz Num 185 G*GATCC	40 U/μl Roche, Mannheim
Ligasen		
T4 DNA-Ligase	1 U/μl	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	1 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

* Ort der Restriktion

3.4.2.2 SUBSTRATE

Tabelle 3.8: Künstliche Substrate der HIV-Protease

Stoff	Struktur	Hersteller
Substrat des Fluoreszenzassays		
Fluoreszenzsubstrat:	DABCYL-GABA-Ser-Gln-Asn-Tyr-* 	Bachem, Heidelberg
Substrat des HPLC basierten Vorläuferassays (Gehring 2001; Hoffmann 2002):		
Proteasesubstrat III:	H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-* -p-nitro-Phe- Glu-Ala-Ile-Ser-NH ₂	Bachem, Heidelberg

* Schnittstelle der HIV-Protease

⁶⁴Datenbank für Restriktionsenzyme (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>); Enzyme Number = Enz Num

3.4.2.3 PROTEASEINHIBITOREN

Tabelle 3.9: Peptidomimetische Proteaseinhibitoren

Wirkstoff	Kürzel	Handelsname	Bezugsquelle
Amprenavir	APV	Agenerase	Glaxo Wellcome, Greenford, GB
Lopinavir (Komb. mit RTV)	LPV	Kaletra	Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA
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

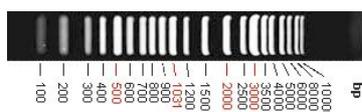
Für Strukturformeln siehe Abbildung 2.15 Seite 19.

3.4.3 DNA/RNA

3.4.3.1 OLIGONUKLEOTIDE UND DNA-FRAGMENTE

Tabelle 3.10: Oligonukleotide und DNA-Fragmente

Name	Sequenz	Orientierung	Lieferant
GeneRuler™	DNA Ladder Mix SM0331		MBI ⁶⁵ , St. Leon-Rot



long template PCR

geno1	³ GCGTGTGGAAATGTGGRAARGA ⁵	sense	AB ⁶⁶ , Weiterstadt
geno2	⁵ TTACATCATTAGTGTGGGCAS ³	antisense	AB, Weiterstadt

nested PCR

P3D2	⁵ CGGGATCCTTCAGAGCAGACCAGAG ³	sense	Roth, Karlsruhe
P4M	⁵ GCCA*AGCTTTCA AAAATTTAAAGTGCAACCAAT ³	antisense	Roth, Karlsruhe
<i>kursiv</i>	Erkennungssequenz	Restriktionsenzym	*
fett	Stoppcodon	<u>unterstrichen</u> bindende Sequenz	Schnittstelle Restriktionsenzym natürliches Ende Proteasesequenz

⁶⁵MBI Fermentas

⁶⁶Applied Biosystems

3. MATERIAL

3.4.3.2 HIV-ISOLATE

3.4.3.2.1 WILDTYPEN

Tabelle 3.11: HIV-1 Wildtypen

Eigenname	Genebank Accesion Nr.	Referenz
MvP-899 Wildtyp ⁶⁷	M15654	Diagnostik MvP (Eberle et al. 1995)
WTLeuven		Universität Leuven, unveröffentlicht

3.4.3.2.2 PROTEASEN AUS DER ROUTINEDIAGNOSTIK

Tabelle 3.12: Proteasesequenzen aus der Routinediagnostik des MvP

Kürzel	Mutationen ⁶⁸	Referenz
73	bedeutend: N88Y, L90M	Routinediagnostik MvP
	geringfügig: M36I	
	andere: I3V, N37S	
86	bedeutend: keine	Routinediagnostik MvP
	geringfügig: K20T, L63P, A71V, I93L	
	andere: I3V, N37S	
174	bedeutend: M46L, V82A	Routinediagnostik MvP
	geringfügig: K20T, L63P, I93L	
	andere: I3V, N37S	

3.4.3.2.3 PROTEASEN MIT BEKANNTEM PHÄNOTYP

Tabelle 3.13: Phänotypisch getestete Proteasen

Kürzel	Mutationen	Referenz
RV1	bedeutend: M46I, N88S	Universität Leuven, Belgien
	geringfügig: D60E, L63P, V77I	
	andere: I3V, N37S	
RV2	bedeutend: keine	Universität Leuven, Belgien
	geringfügig: L10I, A71T	
	andere: I3V, N37S	
RV3	bedeutend: M46I; I84V, L90M	Universität Leuven, Belgien
	geringfügig: L10I, L63P, A71V, V77I	
	andere: I3V, N37S	

⁶⁷bis auf stumme Mutationen identisch zu Wildtyp HXB2

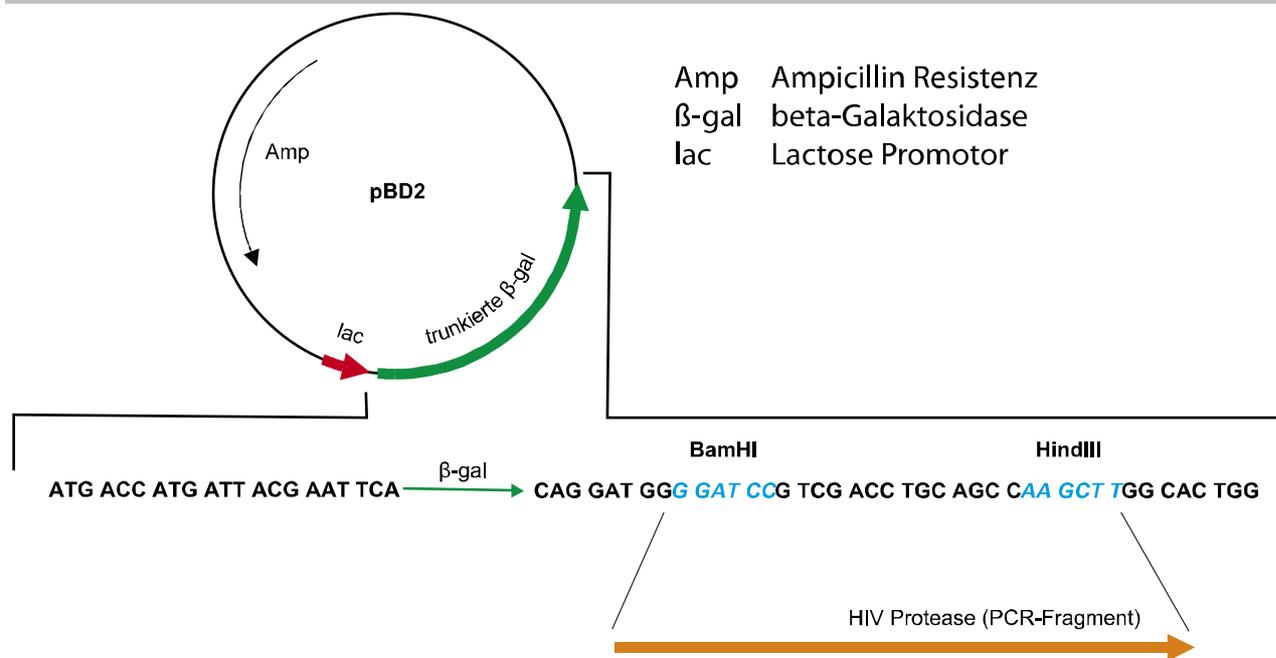
⁶⁸Klassifikation gemäß HIVdB (eng. *major*, *minor*, *other*)

3.4.3.3 VEKTOREN

Tabelle 3.14: Vektor

Plasmidname	relevanter Selektionsmarker	Referenz
pBD2	Amp ^R	Bröker (Bröker 1986)
pUC18	Amp ^R	Stratagene, Heidelberg

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Plasmids pBD2



Darstellung modifiziert nach Bröker (Bröker 1986).

3.4.4 ORGANISMEN

Tabelle 3.15: Elektrokompente Zellen

Bakterium	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli TG1 elektrokompente Zellen	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK ⁻ mK ⁻) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]	Stratagene, Heidelberg

3.4.5 EXPERIMENTIERSÄTZE (KITS)

Tabelle 3.16: Experimentiersätze

Handelsname	Verwendungszweck	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Herstellung Vektor, Minipräparation	Qiagen, Hilden
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Extraktion viraler Nukleinsäuren	Roche, Mannheim
Expand long Template PCR	Generierung von PCR-Fragmenten	Roche, Mannheim
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Extraktion von PCR-Produkt aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit		Qiagen, Hilden

4 METHODEN

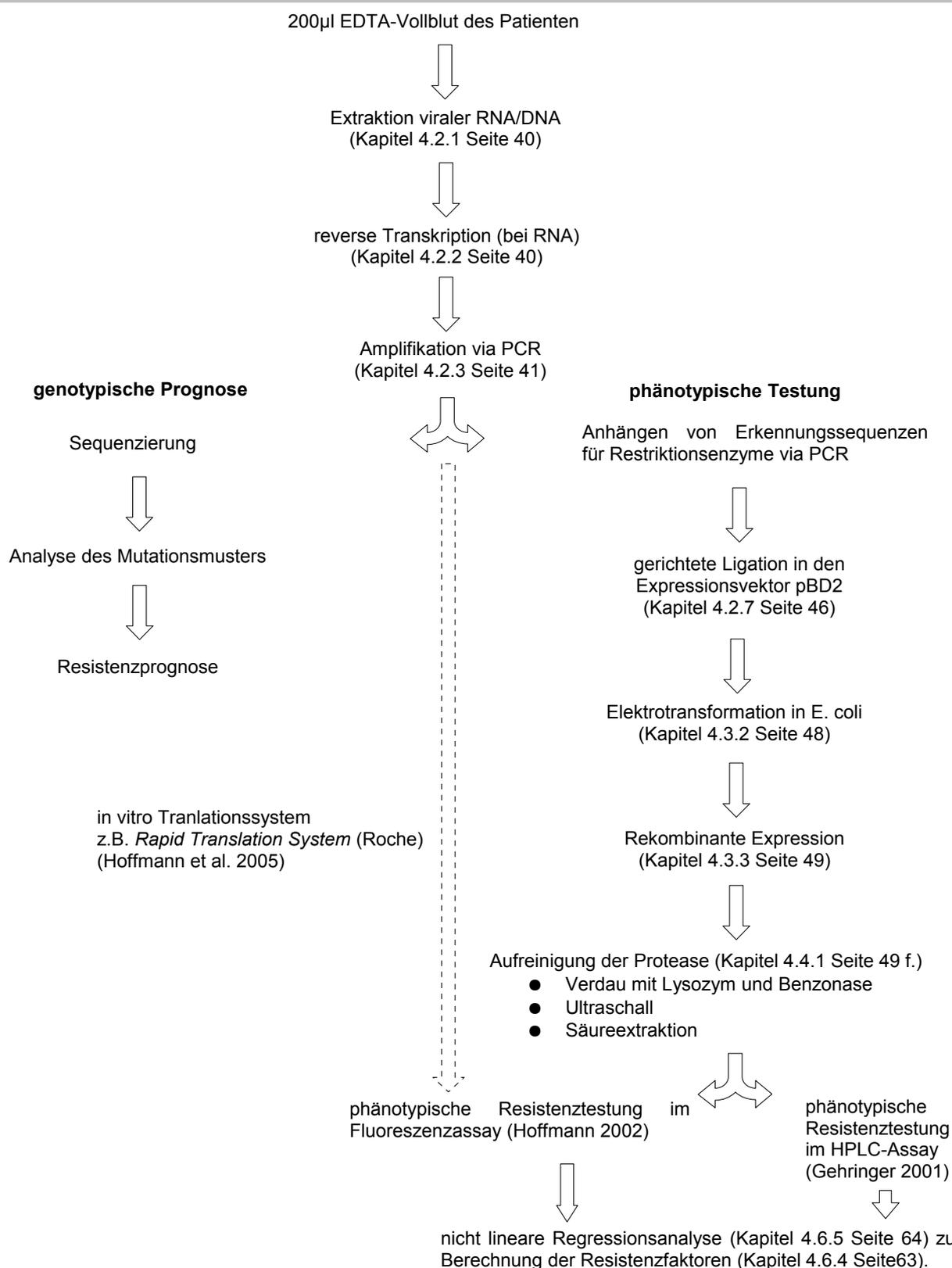
Bevor die einzelnen Arbeitsschritte im Detail beschrieben werden, wird der Gesamtablauf des Assays im Überblick betrachtet.

4.1 ÜBERSICHT ÜBER DEN ABLAUF DES ASSAYS

Aus EDTA-Plasma des Patienten werden die viralen Nukleinsäuren (RNA bzw. DNA) extrahiert. RNA wird in einer reversen Transkription zu cDNA umgeschrieben. Die codierende Sequenz der HIV-Protease wird mit einer PCR spezifisch amplifiziert. An die Enden dieser Sequenz werden in einer zweiten PCR Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme HindIII und BamHI synthetisiert. Das PCR-Produkt und der Vektor pBD2 werden in einem Restriktionsverdau mit HindIII und BamHI geschnitten. Das die Protease codierende PCR-Fragment wird mit dem Vektor zu einem Plasmid ligiert. Dieses Plasmid wird über Elektroporation in *E. coli* transformiert. In einer Kultur wird die rekombinante Expression der HIV-Protease induziert, die in *inclusion bodies* ausfällt. Die Bakterienkultur wird zu einem Pellet abzentrifugiert. Aus dem Pellet wird mit Hilfe von Ultraschall und Säureextraktion Protease aufgereinigt. Durch die Titration auf pH 2 wird unspezifische Enzymaktivität ausgeschaltet. Die Protease wird in einer Ammoniumchloridfällung aufkonzentriert.

Die Aktivität der Protease wird im Mikrotiterplattenformat in Gegenwart der medikamentös eingesetzten Inhibitoren, die in aufsteigenden Konzentrationen angeordnet sind, gemessen. Die Protease schneidet ein künstliches Substrat, das einer der natürlichen Proteaseschnittstellen nachempfunden ist. Die dadurch verursachte Änderung in der Fluoreszenz wird über die Zeit von einem Lesegerät registriert. Aus den Messwerten wird unter Zugrundelegung eines Rechenmodells die Enzymkinetik rekonstruiert. Dabei wird die Inhibitorkonstante K_i berechnet. Durch den Vergleich mit dem K_i Wert des Wildtyps können Resistenzfaktoren angegeben werden.

Abbildung 4.1: Überblick der am MvP etablierten Assays zur Resistenztestung der HIV PR



Die ersten Schritte sind genotypischer Analyse und phänotypischer Testung gemeinsam. Das PCR-Produkt der *long template PCR* kann archiviert und als Ausgangsmaterial für etwaige spätere phänotypische Untersuchungen eingesetzt werden. Der phänotypische Assay baut somit modular auf dem genotypischen Prognosesystem auf.

Eine wesentliche Beschleunigung des Assays sowie eine weitere Kostenreduktion und bessere Standardisierung ist von in vitro Translationssystemen zu erwarten (Hoffmann et al. 2005).

4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.2.1 EXTRAKTION VON DNA UND RNA AUS PATIENTENMATERIAL

Virale Nukleinsäuren wurden aus 200 µl EDTA-Plasma des Patienten mit dem *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

Blutzellen und etwaig vorhandenes Virus werden von einem Puffer und Proteinase K lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren binden in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an Glasfasern (Vogelstein & Gillespie 1979), von denen sie nach mehreren Waschzyklen in reines Wasser eluiert werden.

Als Ausgangsmaterial kann sowohl RNA, als auch DNA eingesetzt werden. Bei 9 von 12 untersuchten Proteasen fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Resistenzmuster in Abhängigkeit der verwendeten Nukleinsäuren (Heid 2006).

4.2.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die reverse Transkription wurde mit dem Primer geno2 folgender Ansatz vorbereitet:

Tabelle 4.1: Reverse Transkription, Mix

Komponente	eingesetztes Volumen	Einheit	Stammlösung
Puffer	4	µl	5x
DTT	2	µl	
dNTP	2	µl	5 mM
Primer 3'	2	µl	geno2 10 pmol/µl
Reverse Transkriptase	0,2	µl	SuperScript II RnaseH ⁻
Mix	10,2	µl	
Eluat aus Extraktion	10	µl	
Gesamtansatz	20,2	µl	

Die Umschreibung wurde in einem Heizblock und einem Gefrierschrank nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Tabelle 4.2: Reverse Transkription, Elongationsprogramm

Schritt Nr.	Temperatur	Zeit
1	65 °C	10 min
2	- 20 °C	>15 min
3	45 °C	1 h
Gesamtzeit: ca. 1,5 h		

4.2.3 POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerasekettenreaktion⁶⁹ (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt spezifisch DNA zwischen zwei künstlich erzeugten Oligonukleotiden (engl. *primer*). Mit zwei geschachtelten Polymerasekettenreaktionen (engl. *nested PCR*) wurde die Sequenz der HIV-Protease amplifiziert und mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen.

Im ersten Schritt wurde mit dem *Expand long template PCR System* (Roche, Mannheim) ein sowohl die Sequenz der Protease, als auch die der Reversen Transkriptase umfassendes Fragment von pol hergestellt.

Tabelle 4.3: Reaktionsansatz der long template PCR

Komponente	eingesetztes Volumen	Einheit	Stocklösung
Aqua dest.	16,25	µl	
dNTP	14	µl	1,25 mM
Puffer	5	µl	10 x
sense Primer	2	µl	10 pmol/µl
antisense Primer	2	µl	10 pmol/µl
DNA-Polymerase	0,75	µl	
Mix	40	µl	
Produkt reverse Transkription	10	µl	
Gesamtansatz	50	µl	

Dieser Ansatz wurde zur Amplifikation mit folgendem Programm in einen UNO II Thermocycler (Biometra, Göttingen) eingesetzt:

Tabelle 4.4: PCR Programm long Template PCR

Schritt Nr.	Temperatur	Zeit	← #	dT	Kommentar	
1	92 °C	2 min		4 °C/s	Aktivierung der Polymerase	
2	92 °C	10 s		4 °C/s	Denaturierung (Auftrennen der Stränge)	
3	50 °C	30 s		4 °C/s	Anlagerung der Primer (engl. <i>annealing</i>)	
4	68 °C	2 min	2	10 4 °C/s	Elongation	
5	92 °C	10 s		2 °C/s	Denaturierung (Auftrennen der Stränge)	
6	50 °C	30 s		1 °C/s	Anlagerung der Primer (engl. <i>annealing</i>)	
7	68 °C	2 min	5	25 1 °C/s	Elongation	
8	68 °C	7 min		4 °C/s	Unterbrechung der Reaktion	
9	4 °C	∞			Konservierung der fertigen Produkte	
← #	Rücksprung auf Schritt Nr. Zahl der Wiederholungszyklen			°C/s	Geschwindigkeit ΔT	Gesamtzeit : 2 h 9 min 9 s HeizdeckelT 105 °C

⁶⁹Erstbeschreibung des Verfahrens durch Mullis und Kleppe (Mullis et al. 1986; Kleppe et al. 1971)

4. METHODEN

Bis hierher deckt sich das Protokoll mit dem der genotypischen Resistenztestung des Max von Pettenkofer-Institutes. Für die Bestimmung des Genotypes wird das PCR-Produkt dieser so genannten *long template PCR* sequenziert. Im phänotypischen Resistenzassay dient es als Matrice für eine 2. PCR. Die 2. PCR generiert eine für die spätere Klonierung in das Plasmid pBD2 geeignetes DNA-Fragment. Dafür wurde der C-terminale Primer so konstruiert, dass die natürliche Proteasesequenz im Amplifikat mit einem Stoppcodon abschließt. Strangabwärts, direkt dahinter, befindet sich die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HindIII (Abbildung 4.2).

Das möglichst genaue Einhalten des natürlichen C-Terminus ist gemäß früherer Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Gehring 2001) von entscheidender Bedeutung für die Expression aktiven Enzyms. Diese Erfahrung deckt sich mit Befunden aus der Literatur (Whitehurst et al. 2003) und steht womöglich in Zusammenhang mit der Autoprozessierung der Protease.

Abbildung 4.2: C-terminaler antisense Primer P4M

5' GCC A*AG CTTTCA | AAA ATT TAA AGT GCA ACC AAT 3'

<i>kursiv</i>	Erkennungssequenz von HindIII
*	Schnittstelle HindIII
fett	Stoppcodon
<u>unterstrichen</u>	bindende Sequenz des Primers.
	Ende der natürlichen Proteasesequenz

Die zweistufige *nested PCR* ersetzt die bisher im Rahmen des Assays übliche *single PCR*, mit der direkt vom Transkript ein klonierungsfähiges DNA-Fragment hergestellt wurde (Hoffmann 2002). Vorteil der *nested PCR* ist die Parallele zur genotypischen Resistenzprognose. Da für die Sequenzierung nicht das gesamte Produkt der *long template PCR* verbraucht wird, kann ein Teil archiviert werden. Bei unklaren Ergebnissen des genotypischen Assays bzw. einem schwer interpretierbaren, multiresistenten Virus, ist es möglich mit dem vorhandenen Material direkt einen phänotypischen Resistenzassay anzuschliessen. Wegen der vorherigen Amplifikation in der *long template PCR* muss lediglich 1 µl des Primäramplifikates in die 2. PCR eingesetzt werden.

Tabelle 4.5: 2. PCR

Komponente	eingesetztes Volumen		Stocklösung
Aqua dest.	19,7	µl	
dNTP	8	µl	1,25 mM
Puffer	5	µl	10 x
MgCl ₂	6	µl	25 mM
sense Primer	5	µl	10 pmol/µl
antisense Primer	5	µl	10 pmol/µl
Taq	0,3	µl	

Komponente	eingesetztes Volumen		Stocklösung
Mix	49	µl	
Amplifikat aus <i>long template PCR</i>	1	µl	
Gesamtansatz	50	µl	

Tabelle 4.6: Thermocycler Programm 2. PCR

Schritt Nr.	Temperatur	Zeit	← #	dT	Kommentar
1	95 °C	12 min		4 °C/s	Aktivierung der Polymerase
2	94 °C	30 s		4 °C/s	Denaturierung DNA (Auftrennen der Stränge)
3	48 °C	45 s		4 °C/s	Anlagerung der Primer (engl. <i>annealing</i>)
4	72 °C	1 min	2 40	4 °C/s	Elongation
5	72 °C	15 min		4 °C/s	Unterbrechung der Reaktion
6	4 °C	∞ (Pause)			Konservierung der fertigen PCR-Produkte

← Rücksprung auf Schritt Nr. Gesamtzeit : 2 h 34 min 12 s
Zahl der Wiederholungen, bevor Programm fortgesetzt wird HeizdeckelT 105 °C
dT Geschwindigkeit der Temperaturänderung

4.2.4 GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN

Der Vektor pBD2 und das PCR-Amplifikat wurden vor der Restriktion in einer Gelelektrophorese von eventuellen Verunreinigungen separiert. TAE-Puffer wurde mit 1,4 % bzw. 1 %⁷⁰ (w/v) Agarose vermischt, in der Mikrowelle kurz aufgekocht und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Durch Einstecken eines Kamms wurden Taschen für das Befüllen mit Probenmaterial ausgespart. Beim Erkalten polymerisiert die Agarose zu einer gleichmäßigen „porösen“ Gelmatrix, die mit TAE-Puffer bedeckt wurde. Um die DNA im Gel später unter UV-Licht sichtbar machen zu können, wurde Ethidiumbromid⁷¹ in einer Zielkonzentration von 0,5 µg/ml beigemischt. Die Geltaschen wurden mit PCR-Amplifikat bzw. pBD2 zusammen mit je 1/5 Volumen 6x *loading dye* beschickt.

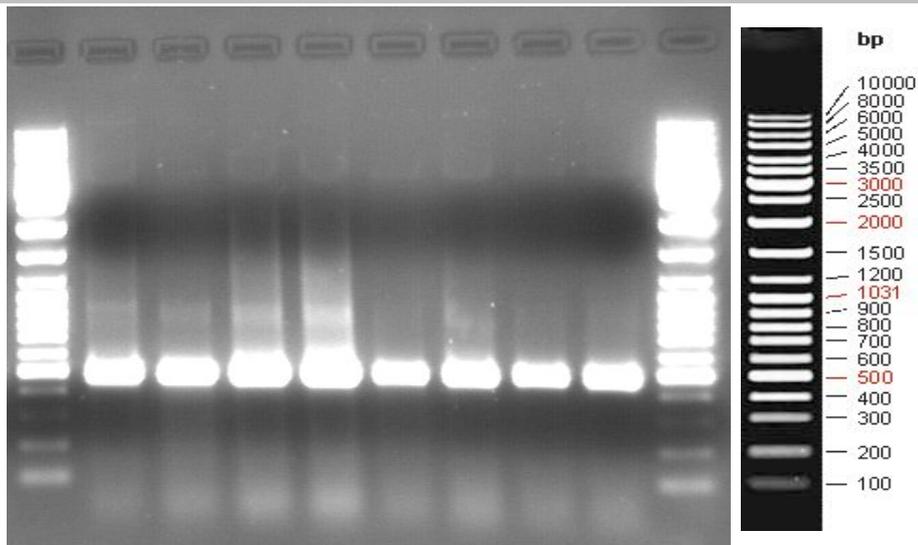
Nach dem Anlegen einer elektrischen Gleichspannung⁷² wandern die geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld durch die Agarosematrix. Ihre Geschwindigkeit ist dabei wesentlich von ihrer Größe⁷³ abhängig. Das führt zu einer Auftrennung. Ein parallel aufgetragener Mix aus DNA-Fragmenten bekannter Größe und Konzentration erlaubt die Einordnung der Proben (Sambrook et al. 1989).

⁷⁰Für die spätere Aufreinigung im QIAquick Gelextraktionssystem muss der Agarosegehalt auf 1% limitiert werden.

⁷¹Ethidiumbromid fluoresziert nach Interkalieren mit DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht.

⁷²Zur Vermeidung einer Überhitzung bzw. Verformung des Gels orientiert sie die angelegte Spannung an Größe der Elektrophoresekammer und Agarosegehalt des Gels. Für die Präparation von PCR-Produkt wurde eine kompakte 50ml Elektrophoresekammer, eine konstante Gleichspannung von 50 V bei ca. 400 mA und eine Laufzeit von mind. 60 Minuten gewählt.

⁷³Genau genommen ist die Geschwindigkeit, mit der sich die Nukleinsäuren im elektrischen Feld bewegen, das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels mehrerer Faktoren, wie u.a. Ladungsgehalt des Nukleinsäurefragments, Konformation und Gewicht.

Abbildung 4.3: Aufreinigung des PCR-Produktes über ein Agarosegel

Fotografie eines mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Gels unter UV-Beleuchtung. Aufgetragen wurden die Produkte der 2. PCR. Äußerste Bahnen links und rechts: Vergleichsfragmente bekannter Größe (MBI #SM0331). Mittig: PCR-Produkte. Rechts: Theoretischer Vergleichsmaßstab nach Firmenangaben. Die berechnete Größe des PCR-Fragmentes liegt bei 434 Basenpaaren (bp).

Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA mit dem *QIAex II Agarose Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) extrahiert. Dieser Kit wurde im Verlauf durch den schnelleren *QIAquick Gel Extraction Kit* ersetzt. Funktionsprinzip beider Kits ist die Adsorption von DNA an Silikapartikel (bzw. eine Membran beim QIAquick) und anschließende Elution nach mehreren Waschzyklen.

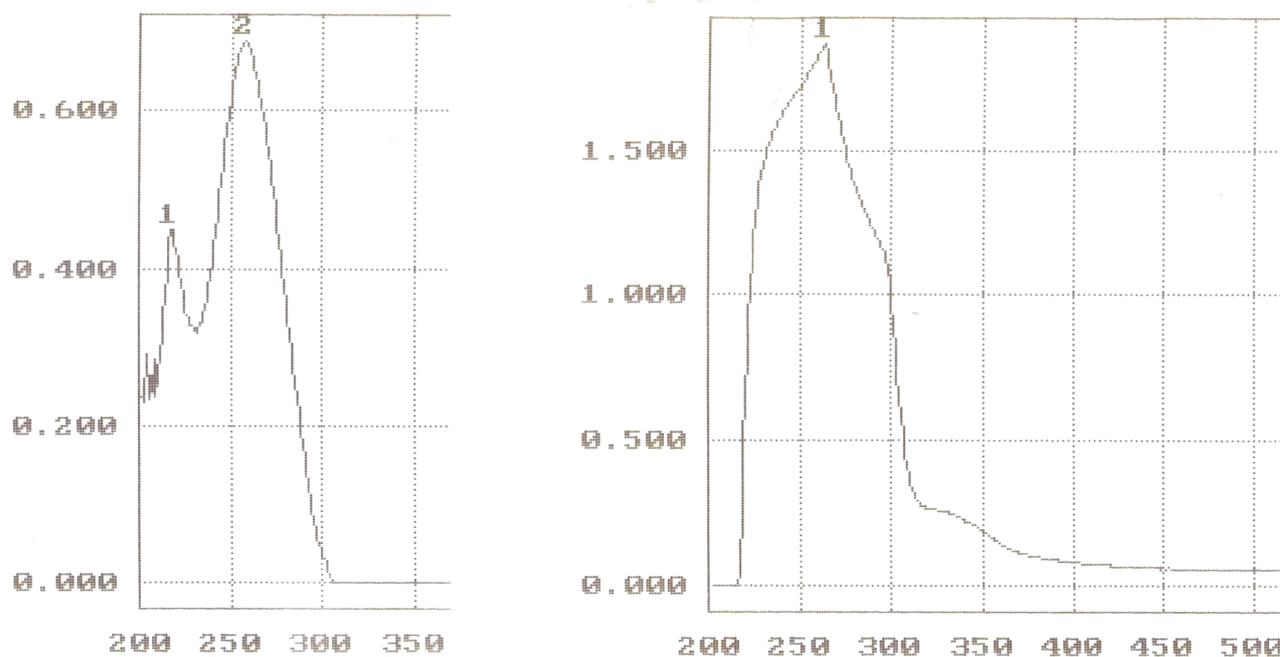
4.2.5 PHOTOMETRISCHE ANALYSE DER NUKLEINSÄUREN

Konzentration und Reinheitsgrad von DNA wurden via Photometer⁷⁴ analysiert. In einer speziellen Küvette⁷⁵ wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm (OD_{260}) und bei 280 nm (OD_{280}) gemessen. Eine Konzentration von 50 µg/ml Nukleinsäuren entspricht einer OD_{260} von 1 (Sambrook et al. 1989). Daraus kann der Nukleinsäuregehalt grob berechnet werden. Mit dem Quotienten $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ wird die Verunreinigung – insbesondere durch Protein – abgeschätzt. Proben mit einem $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} > 1,8$ gelten als rein, unterhalb von $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} < 1,6$ als kontaminiert. Geleluate mit $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} < 1,6$ wurden deshalb verworfen. Eine etwas differenziertere Beurteilung des Reinheitsgrades ist durch Beurteilung von Morphologie und Flankensteilheit des gesamten Absorptionsspektrums im Bereich zwischen 200 nm und 300 nm möglich.

⁷⁴Ultrospec Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

⁷⁵Während bisher Quarzküvetten von genau 1 cm dicke notwendig waren, sind inzwischen Einweg-Plastikküvetten verfügbar. Verunreinigungen sind so ausgeschlossen und das Verwerfen eines kostbaren Aliquots der Probe erübrigt sich.

Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum



Links: Bei gut aufgereinigter DNA ist ein klare Spitze mit steilen Flanken zu erkennen. Rechts: Die abgeflachten Flanken und die verbreiterte Basis weisen auf Verunreinigungen hin.

4.2.6 RESTRIKTION

Aus dem Gel eluiertes PCR-Produkt und der Vektor pBD2 wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI nach folgendem Ansatz über 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert:

Tabelle 4.7: Restriktion

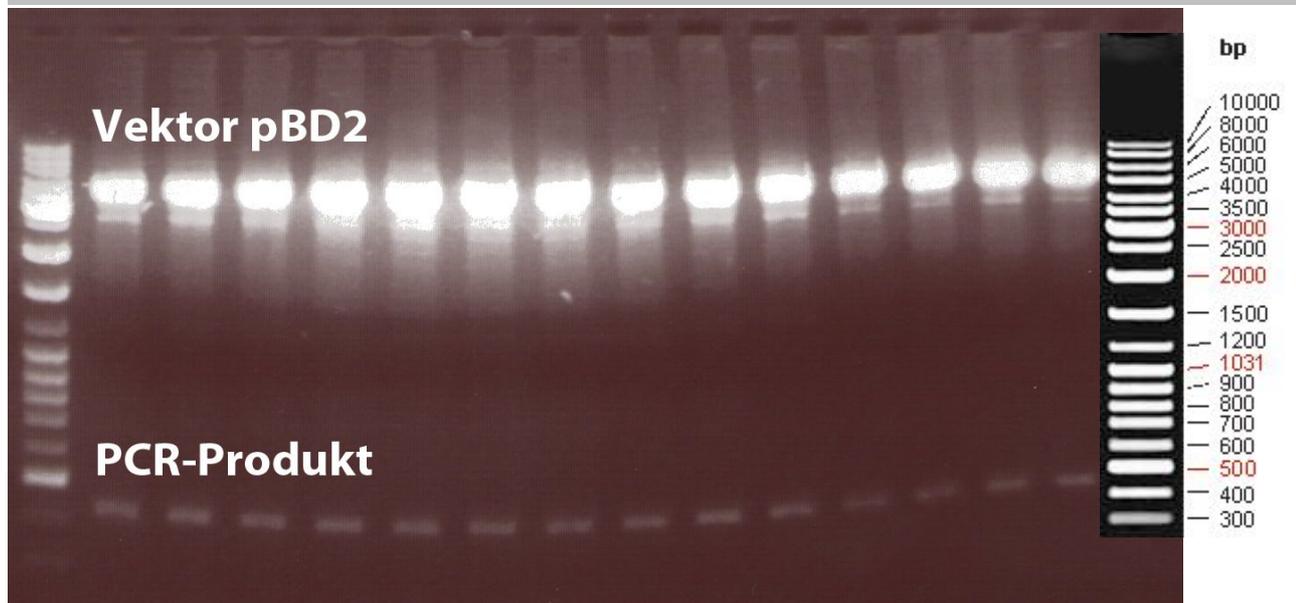
Komponente	eingesetztes Volumen	Stocklösung
PCR-Amplifikat bzw. Vektor	max. 35 μ l	
Puffer B	$\frac{2U}{\mu\text{g DNA}}$ μ l	10 x, mit Enzymen ausgeliefert
BamHI	$\frac{U}{\mu\text{g DNA}}$ μ l	40 U/ μ l
HindIII	$\frac{U}{\mu\text{g DNA}}$ μ l	40 U/ μ l
H ₂ O	x μ l	Ampuwa
Gesamtvolumen	max. 50 μ l	

Durch die Restriktion werden komplementäre, für eine Ligation geeignete, haftende DNA-Termini, so genannte *sticky ends*, geschaffen. Als Vorbereitung für die folgende Ligation wurden die restringierten DNA Fragmente mit dem *QIAex II Agarose Gel Extraction Kit* aufgereinigt.

Ein 5 μ l-Aliquot wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um für die Ligation die vorliegende DNA-Menge durch Vergleich mit dem Größenstandard abzuschätzen. Gleichzeitig wurde durch Darstellung des Wildtyp-Inserts die korrekte Restriktion des Vektors überprüft. Wie bei Gehringer (Gehrin-

ger 2001) beschrieben, müssen auch die Fragmentgrößen der PCR-Produkte mit den zu Erwartenden abgeglichen werden. Durch stumme Mutationen können in Einzelfällen zusätzliche Schnittstellen entstehen.

Abbildung 4.5: Überprüfung der Restriktion



Fotografie eines mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Gels unter UV-Beleuchtung. Aufgetragen wurde der Vektor pBD2 nach Restriktion. Links: Vergleichsfragmente bekannter Größe (MBI #SM0331). Mittig: geschnittener Vektor. Rechts: Theoretischer Vergleichsmaßstab nach Firmenangaben. Die berechnete Größe des Vektors pBD2 liegt bei 3790 Basenpaaren (bp), die des PCR-Fragmentes bei 434 bp.

4.2.7 LIGATION

Geschnittenes PCR-Produkt und Vektor wurden über Nacht bei ca. 4-10 °C im Kühlschrank in folgendem Ansatz ligiert:

Tabelle 4.8: Ligation

Komponente	eingesetzte Menge	Stocklösung
Vektor und Insert	je ca. 50 ng	Vektor pBD2 (~ 1 µl) und Amplikon (~10-15 µl) nach Restriktion
Puffer	2 µl	10 x Ligationspuffer (mit Ligase ausgeliefert)
Ligase	1 µl	1/10 U T4 DNA Ligase
H ₂ O	x µl	Ampuwa
Gesamtvolumen	max. 20 µl	(Volumen sollte so gering wie möglich gehalten werden)

4.2.8 ETHANOL-FÄLLUNG

Das ligierte Plasmid muss für die Transformation in *E. coli* von störenden Ionen und Proteinen befreit werden. Das Volumen des Ligationsansatzes wurde dazu auf 100 µl erhöht und mit 10 µl einer 3 M NaAc-Lösung pH 5,2 versetzt. Es wurden 3 Volumina (330 µl) reinstes Ethanol zugegeben. Zur Begünstigung einer Präzipitation wurde 1 µl Hefelösung beigemischt. Durch Inkubation bei -20 °C über 20 Minuten wurden die Nukleinsäuren ausgefällt und über 25 min bei 14000 rpm in der

Tischzentrifuge 5417C zu einem Pellet abzentrifugiert, das nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol in einem kleinen Volumen reinstem Wasser resuspendiert wurde.

4.2.9 PRÄPARATION VON VEKTOR

4.2.9.1 HERSTELLUNG VON VEKTOR ZUR KLONIERUNG

Plasmid für die Klonierung wurde aus einem Aliquot von pBD2-Plasmid (Bröcker 1986) mit dem *Quiagen Plasmid Midi Kit* nach dem Protokoll des Herstellers generiert. Das in unserer Arbeitsgruppe vorhandene Plasmid enthält bereits die Proteasesequenz des Wildtypen WT899.

4.2.9.2 KONTROLLPRÄPARATION

Zur Überprüfung der Transformation wurde aus einem Aliquot der transformierten Zellen mit dem *Quiagen Plasmid Mini Kit* Plasmid gewonnen. Durch eine Restriktion und anschließendes Auftragen der Restriktionsfragmente auf ein Agarosegel wurde die Existenz eines *Inserts* überprüft.

4.2.10 SEQUENZIERUNG

Ein Aliquot des Plasmids aus der Kontrollpräparation wurde zur anschließenden Sequenzierung mit einer modifizierten Didesoxinukleotid-Methode (Sanger et al. 1977) in folgenden Mix eingesetzt:

Tabelle 4.9: 2. PCR

Komponente	eingesetztes Volumen		Stocklösung
Big Dye-Mixtur	8	µl	Big Dye ⁷⁶
sense/antisense Primer	1	µl	Primer P3 oder Primer P4
Wasser	ca. 5	µl	Ampuwa
Mix	ca. 15	µl	
aufgereinigter Vektor	ca. 5	µl	
Gesamtansatz	20	µl	

Der Mix wurde mit folgendem Thermocycler-Programm prozessiert:

Tabelle 4.10: PCR-Programm Sequenzierung

Schritt Nr.	Temperatur	Zeit	←	#	dT	Kommentar
1	96 °C	30 s			4 °C/s	Denaturierung der DNA (Auftrennung Stränge)
2	55 °C	10 s			4 °C/s	Anlagerung der Primer (engl. <i>annealing</i>)
3	60 °C	4 min	1	25	4 °C/s	Polymerisation
4	4 °C				4 °C/s	Konservierung des Ansatzes

← Rücksprung auf Schritt Nr.

Zahl der Wiederholungen, bevor Programm fortgesetzt wird

dT Geschwindigkeit der Temperaturänderung in °C/s

⁷⁶Spezieller vom Hersteller zur Verfügung gestellter Mix mit nicht publizierter Zusammensetzung.

Die Sequenzierung wurde im Rahmen der Routinediagnostik auf einem *ABI Prism DNA Sequencer 977* (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem *Staden Package* (Open Source).

4.3 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

4.3.1 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN

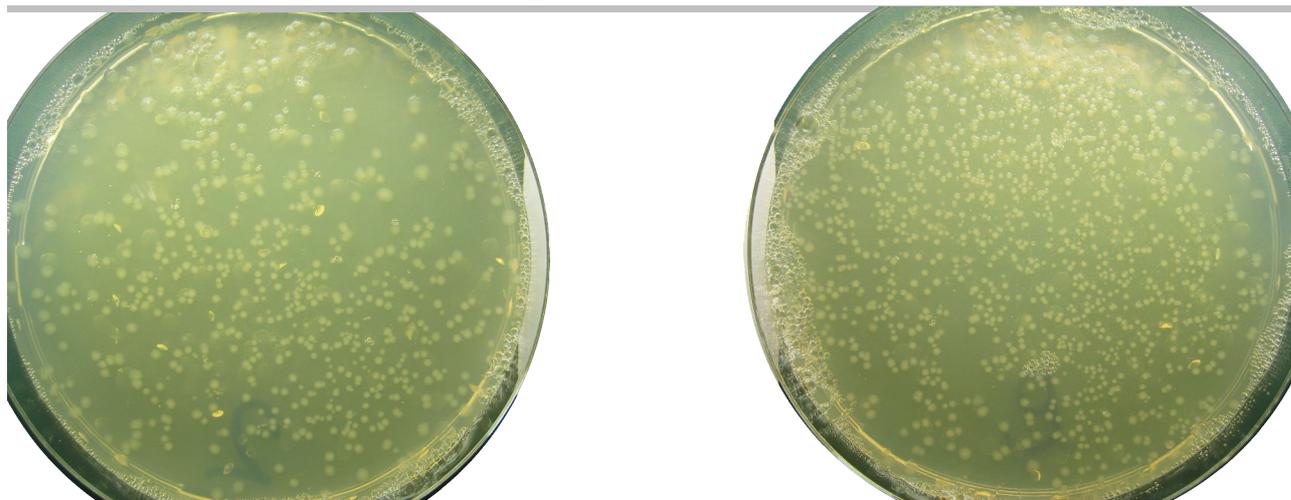
Elektrokompetente *Escherichia coli* Bakterien wurden, ausgehend von TG1 Zellen der Firma Stratagene, in Anlehnung an ein von Dower publiziertes Protokoll (Dower et al. 1988) hergestellt. Aus 100 µl Glycerinstock wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator unter ständigem Schütteln (225 rpm) eine Kultur herangezogen. Daraus wurden am folgenden Tag 10 ml Aliquots in jeweils 500 ml LB-Medium überimpft, wo sie unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 1,0 angezüchtet wurden. In vorgekühlten Zentrifugenflaschen (250 ml) wurden die Kulturen 10 Minuten lang auf Eis gelagert und dann 10 Minuten bei 2600 x g⁷⁷ und 4 °C zentrifugiert. Es folgten 3 Waschzyklen mit bidestilliertem Wasser (Ampuwa) in welchen das Pellet nacheinander in 250 ml, 125 ml und 50 ml resuspendiert und jeweils unter den genannten Bedingungen zentrifugiert wurde. Zwei Waschungen mit 15 ml und 1 ml 10 %iger kalter Glycerinlösung wurden angeschlossen. Von dieser Lösung wurden Aliquots zu 150 µl in einer Trockeneis-Aceton-Lösung gefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Glycerinkulturen konnten 6 Monate ohne merkliche Qualitätseinbußen für die Elektroporation eingesetzt werden.

4.3.2 ELEKTROTRANSFORMATION

Die elektrokompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Je 40 µl wurden in gekühlten Reaktionsgefäßen vorsichtig (Antippen) mit 2-5 µl des aufgereinigten Ligationsansatzes vermischt und 10 Minuten auf Eis gelagert. Als Kontrolle wurde das Plasmid puc18 nach Anleitung des Herstellers mitgeführt. Die Suspensionen wurden in kühle Elektroporationsküvetten mit einer Weite von 0,2 mm gefüllt und bei 2,5 kV in einem Gene Pulser II (BioRad, München) transformiert. Die Kondensatorkapazität betrug 25 µF, der Puls-Controller-Widerstand 200 Ω. Direkt nach dem Stromstoß wurde den Ansätzen 950 µl SOC-Medium zugegeben. Bei 37 °C und 225 rpm im Inkubationsschüttler wurde den Zellen eine Stunde lang Gelegenheit zur phänotypischen Expression der Transformation im Inkubationsschüttler gegeben.

Zur Kontrolle des Transformationsergebnisses wurden je 100 µl der Ansätze auf LB-Ampicillin-Kulturplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Der Rest wurde über Nacht in 9 ml LB-Ampicillin-Medium bei 37 °C und 225 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert.

⁷⁷± 4000 rpm in der verwendeten Sorvall-Zentrifuge mit GSA-Rotor

Abbildung 4.6: Kontrollplatten nach erfolgreicher Transformation

LB-Ampicillin Kulturplatten, auf die ein Aliquot von 100 μ l des Transformationsansatzes ausplattiert wurde, nach Inkubation im Wärmeschrank über Nacht.

4.3.3 REKOMBINANTE EXPRESSION DER HIV-PROTEASE

Die Übernachtskulturen wurden in 500-ml-Falcons bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen. Zugabe von Lactose bis zu einer Zielkonzentration von 0,2 % induzierte über einen auf dem pBD2-Plasmid enthaltenen lac-Promotor die Expression der HIV-Protease. Die Protease entsteht dabei als Fusionsprotein mit der β -Galaktosidase (Abbildung 3.1 Seite 37). Nach 2,5 Stunden wurden die Kulturen bei 4000 x g zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C konserviert.

4.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

4.4.1 AUFARBEITUNG DER REKOMBINANT EXPRIMIERTEN PROTEASE

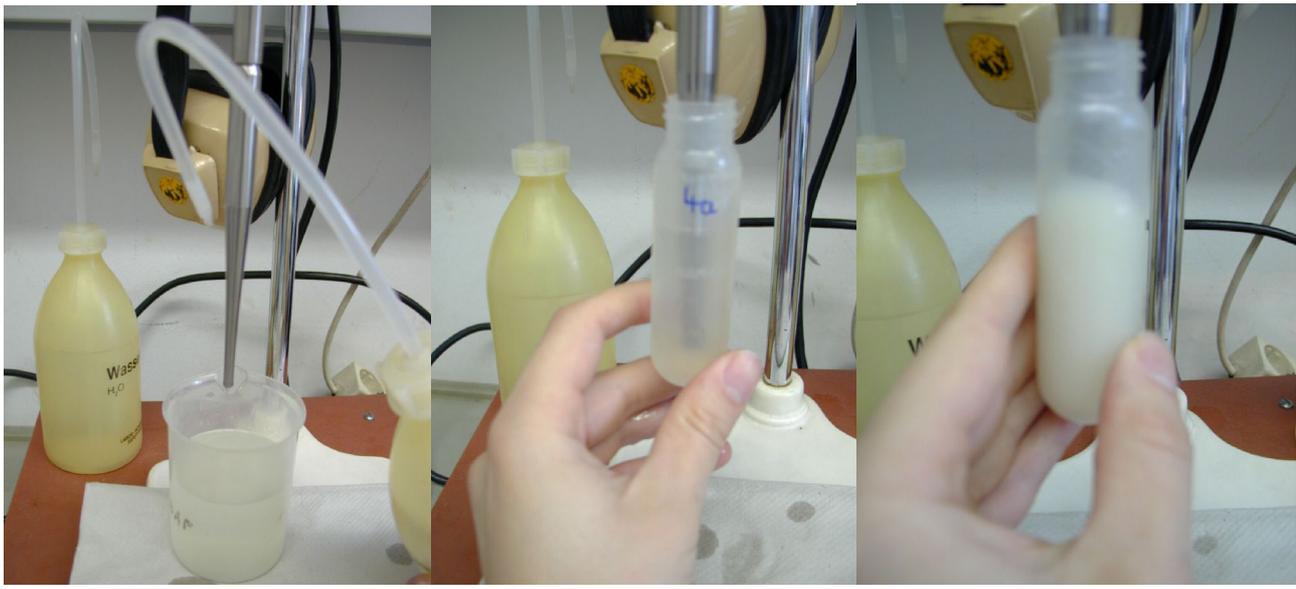
Die Protease fällt in *E. coli* wegen ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Zytotoxizität in Form so genannter Einschlusskörper (engl. *inclusion bodies*) aus. Zur Messung der Enzymkinetik im Fluoreszenzassay muss aus diesen *inclusion bodies* aktives Enzym präpariert werden.

Die Zellwände der Bakterien wurden mit den Enzymen Benzonase⁷⁸ und Lysozym⁷⁹ zerstört. Mit Hilfe eines Ultraschallgerätes wurden die *inclusion bodies* in fünf Zyklen in jeweils 30ml PBS-Puffer und 0,2 % Tween dispergiert und anschließend 10 min bei 17000 x g und 4° C abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Das Pellet wurde danach mit Ultraschall in 10ml Lösung 1 resuspendiert.

⁷⁸Die Benzonase ist eine unspezifische Nuklease, die die Viskosität der Probe vermindert; Zielkonzentration 1U/ml (www.bezonase.de) (Gross et al. 1995)

⁷⁹Lysozym ist eine Muramidase, die das bakterielle Zellwandgerüst angreift, 200 μ g/ml (Schlegel 1992)

Abbildung 4.7: Ultraschallbehandlung von *inclusion bodies*



Links: Ultraschallgerät. Mitte: Probe vor Resuspension. Rechts: Probe während der Ultraschallbehandlung.

4.4.2 SÄUREEXTRAKTION

Um unspezifische Proteaseaktivität anderer zelluläre Enzyme zu eliminieren und die Protease weiter aufzureinigen, wurde die in Eis gelagerte Lösung schrittweise mit einer 0,1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 heruntertitriert und 30 Minuten gerührt. Während die ungewöhnlich säurestabile Protease in monomerer Form in Lösung geht, denaturieren andere zelluläre Proteine, fallen aus und werden in 10-minütiger Zentrifugation bei 17000 x g und 4 °C separiert.

Abbildung 4.8: HCl-Titration



Links: praktische Umsetzung der HCl-Titration im Labor. Rechts: pH-Messung.

Zur im Überstand gelösten Protease wurde 1 Volumen Lösung 2 zugegeben und das Gemisch 30 Minuten auf Eis gerührt. Die gelösten Protease Monomere lagern sich währenddessen zu Dimeren zusammen und gehen dadurch in den aktiven Zustand über.

4.4.3 AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Für die Messung der Enzymaktivität muss die Protease aufkonzentriert werden. Das geschah durch eine Fällung. Nachdem der Lösung unter ständigem Rühren auf Eis Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 50 % (314 g/l) zugegeben worden war, wurde die Protease bei 2-8 °C in einem Kühlschrank über Nacht bzw. mind. 3 Stunden ausgefällt und bei 17000 x g und 4 °C über 15 Minuten zu einem Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Etwaige Reste des Überstandes wurden durch eine 2. Zentrifugation entfernt.

Dieses Pellet wurde in 300-500 µl Assay-Puffer mit 10 % DMSO und 0,1 % NP40 resuspendiert, indem es 30 Minuten auf Eis gelagert und alle 5 Minuten durchmischt wurde. Diese Proteaselösung wurde direkt in den Fluoreszenzassay eingesetzt.

4.5 MESSUNG DER PROTEASEAKTIVITÄT

Die Messung der Proteaseaktivität wurde in diesem Assay mithilfe eines künstlichen Fluoreszenzsubstrates realisiert. In der Vergangenheit wurden u. a. Immunoblots des gag Precursors und seiner geschnittenen Fragmente (Seelmeier et al. 1988), HPLC-Analysen (Billich et al. 1988; Gehring et al. 2003) oder Dünnschichtelectrophoresen (Kotler et al. 1988) der Fragmente eines künstlichen Substrates für die Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt. Die meisten dieser Verfahren sind jedoch für enzymkinetische Messungen in größerem Maßstab unpraktikabel.

4.5.1 DAS KÜNSTLICHE SUBSTRAT DER HIV-PROTEASE

Das künstliche Substrat besteht aus einem *Fluorophor* und einem *Quencher*, die über eine Peptidkette miteinander verbunden sind. Bei einem *Fluorophor* handelt es sich um einen Stoff, der nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung selbst Strahlung eines niedrigeren Energiegehaltes (also größerer Wellenlänge) aussendet. Diesen Vorgang nennt man Fluoreszenz. Das Wellenspektrum, von dem sich ein Fluorophor anregen lässt, heißt Exzitationsspektrum, die von ihm abgegebene Strahlung Emissionsspektrum. Ein *Quencher* (engl. *to quench* dämpfen) ist ein Stoff, der Fluoreszenz dämpft, indem er die von elektromagnetischer Strahlung auf ein Fluorophor übertragene Energie via intramolekularer Elektronenverschiebungen absorbiert. Mit einem Quencher zu einem Molekül verbunden, entledigt sich das Fluorophor der zusätzlichen Energie anstelle von Abstrahlung (Fluoreszenz) durch Übertragung auf den Quencher. Die Fluoreszenz nimmt ab. Das gelingt umso besser, je exakter das Emissionsspektrum des Fluorophors und das Absorptionsspektrum des Quenchers übereinstimmen.

Im Fall des hier eingesetzten Substrates wird als Fluorophor EDANS⁸⁰ und als Quencher DABCYL⁸¹ eingesetzt. EDANS ist mit dem C-Terminus, DABCYL mit dem N-Terminus eines Oktapep-

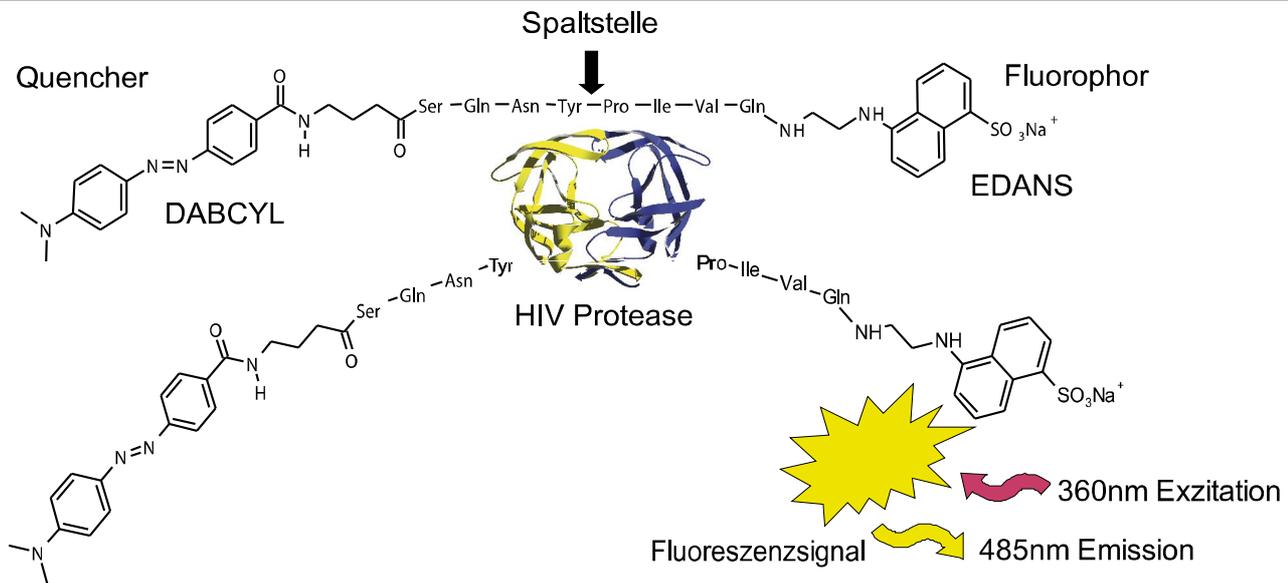
⁸⁰5-[(2-aminoethyl) amino] Naphthalen I - Sulfonat

⁸¹4- (4-Dimethylaminophenylazo) Benzoat

4. METHODEN

tids⁸² verbunden, das der natürlichen p17/24 Schnittstelle der HIV-Protease (Abbildung 2.11, Seite 16) im Pr55^{gag}-Precursor nachempfunden ist (Matayoshi et al. 1990).

Abbildung 4.9: Das künstliche Substrat der HIV-Protease



Modifiziert nach einer Darstellung von Matayoshi (Matayoshi et al. 1990)

Diese Schnittstelle ist spezifisch für die HIV-Protease (Bagossi et al. 2005) und gilt als repräsentativ für die Gesamtaktivität des Enzyms (Hoffmann 2002).

Die Protease hydrolysiert die Peptidbindung zwischen Tyrosin und Prolin, und trennt damit den Quencher vom Fluorophor ab. Das Fluorophor fluoresziert nun ungehemmt. Nach Anregung bei 360 nm emittiert es bei 485 nm.

4.5.2 DER FLUORESZENZASSAY

Die durch die Proteolyse des künstlichen Substrates verursachte Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von etwa 100 Minuten vom Lesegerät FL600 (Biotek-Kontron) alle 2,5 Minuten ausgelesen. Daraus resultieren 40 Messpunkte.

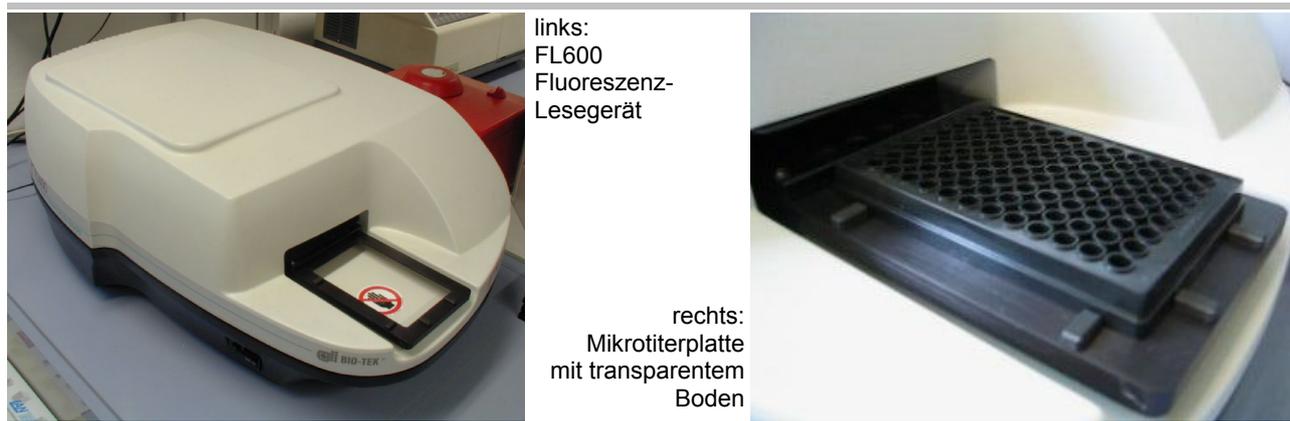
Für die Anregung wurde ein Exzitationsfilter mit einer Wellenlänge von 360 nm bei 40 nm Bandbreite verwendet. Die Emission des gespaltenen Substrates wurde hinter einem Filter mit einer Wellenlänge von 485 nm bei 20 nm Bandbreite registriert. Der vom Gerät zu jedem Zeitpunkt ausgegebene Wert wurde aus 10 unabhängigen, geräteinternen Messungen gemittelt. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte vom Gerät 10 Sekunden lang geschüttelt, um Homogenität der Fluoreszenz innerhalb der Wells zu erreichen. Zwischen Plattenbewegung und Messung wurde ein Intervall von mindestens 0,35 s vorgegeben, um Artefakte durch einen sich bewegenden Flüssigkeitsspiegel zu vermeiden. Die Sensitivität des Fotomultipliers wurde in Kombination mit Mikrotiterplatten mit transparentem Boden (Corning, Wiesbaden) auf 170 Einheiten eingestellt⁸³. Damit wird

⁸²Um von der HIV-Protease erkannt zu werden, muss das Substrat aus mindestens 7 Aminosäuren bestehen (Billich et al. 1988).

⁸³zwischen 0 – 220 proprietären, dimensionslosen Einheiten frei wählbar.

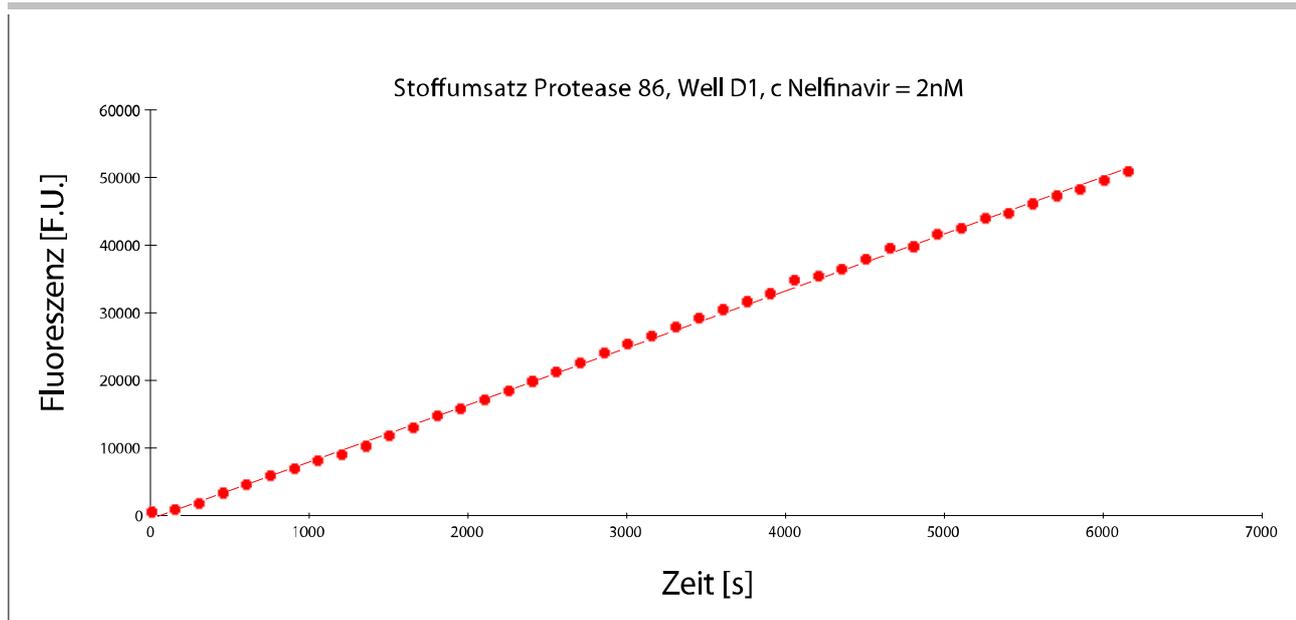
das im Test maximal zu erwartende Fluoreszenzsignal von 2000 nM EDANS in Anwesenheit von 10 μ M Substrat (Hintergrundfluoreszenz) noch auf die von 0-99999 Fluoreszenzeinheiten (F.U.) reichende Skala des Gerätes abgebildet. Eine individuelle Anpassung der Sensitivität, je nach Aktivität der gemessenen Proteasen, ist sinnvoll. Zur Minimierung von Rauschen gilt es jedoch, die Sensitivität so gering wie möglich zu halten. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch den transparenten Plattenboden.

Abbildung 4.10: Fluoreszenz-Lesegerät FL600



Aus der gemessenen „Punktwolke“ der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten konstruiert die Steuersoftware KC4 via linearer Regressionsanalyse eine Gerade, deren Steigung dem Substratumsatz je Zeiteinheit entspricht. Die Geschwindigkeit wird als Fluoreszenzeinheiten pro Minute angegeben, kann unter Verwendung einer EDANS-Eichkurve aber problemlos in den nanomolaren Umsatz/Minute umgerechnet werden.

Abbildung 4.11: Berechnung des Stoffumsatzes mittels linearer Regressionsanalyse

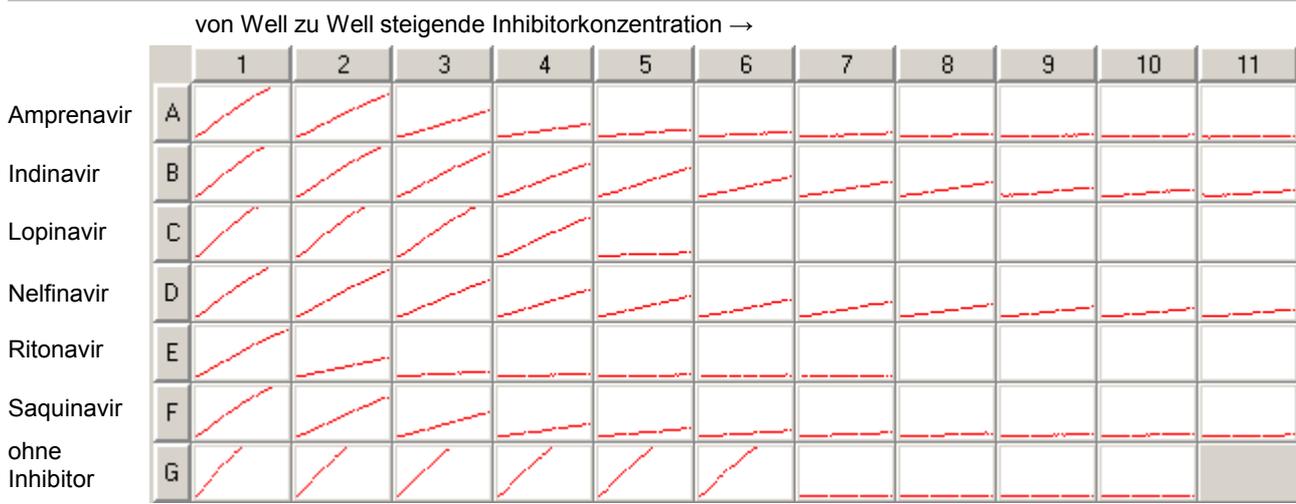


● Messpunkte Durchschnittlicher Stoffumsatz v_i : 506.57 F.U./min Korrelationskoeffizient: 0,9996

Zu sehen sind die Messpunkte eines einzelnen Wells der Mikrotiterplatte, aus denen durch lineare Regression der Substratumsatz berechnet wird. Modifiziert nach einer Bildschirmdarstellung der Steuersoftware KC4 des Fluoreszenzreaders FL600.

Der Substratumsatz wird in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen und in Abwesenheit von Inhibitor bestimmt. Dabei wurden die Wells auf der Mikrotiterplatte so angeordnet, dass ein Inhibitor jeweils eine Zeile (A-H) belegt und die Inhibitorkonzentration von Spalte zu Spalte (1-12) zunimmt. Der Substratumsatz nimmt dementsprechend auf einer Mikrotiterplatte von links nach rechts ab. Die Graphen verlaufen dem entsprechend immer flacher.

Abbildung 4.12: Kinetische Graphen einer Mikrotiterplatte

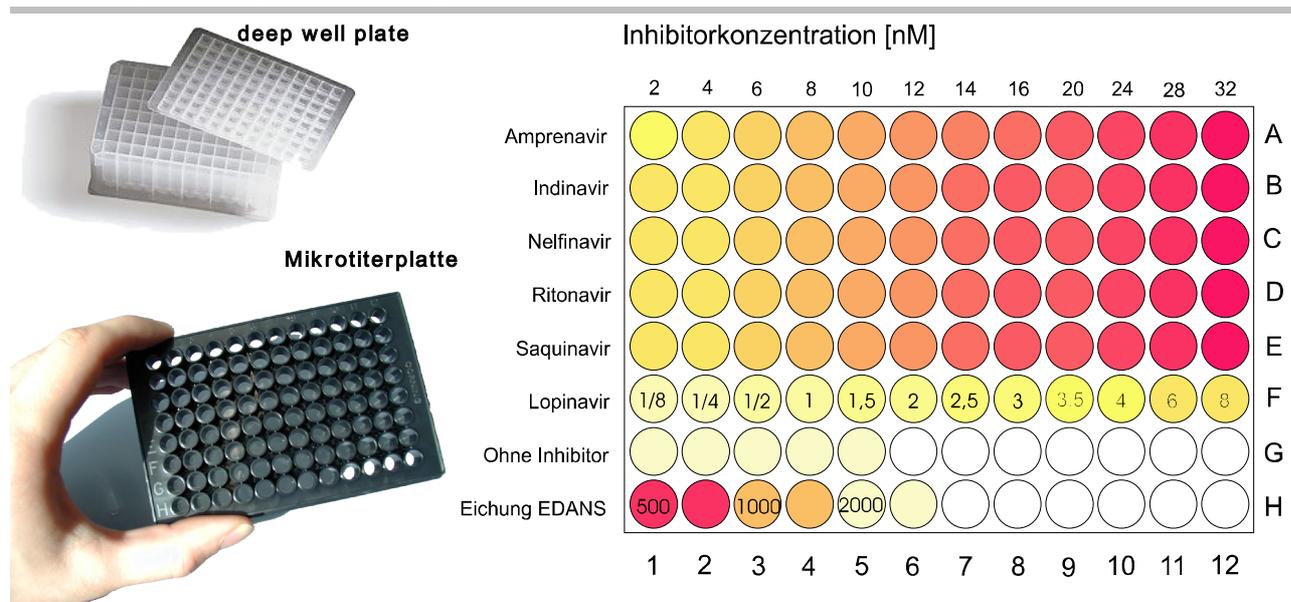


Modifizierte Bildschirmfotografie einer Darstellung der Steuersoftware KC4 bei Protease 74.

Das nutzbare Well-Volumen der verwendeten Mikrotiterplatten betrug 200 µl. Nach dem bisherigen Protokoll wurden in alle Wells 180 µl Assay-Puffer vorgelegt und anschließend jedem Well 20 µl Mix aus Substrat, Inhibitor, DMSO und NP40 zugegeben. Um die Vergleichbarkeit zwischen ver-

schiedenen Messplatten (z. B. Vergleich zur Wildtypferenz) zu optimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu übergegangen, den Mix für 4 Platten in einer tieflumigen, verschließbaren Mikrotiterplatte (engl. *deep well plate*) zu präparieren. Messplatten können bei Bedarf mit einer Multipipette rasch aus diesem Stock hergestellt werden. Die *deep well plate* kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mind. 3 Monate als Quelle für Messplatten genutzt werden, ohne dass sich signifikante Qualitätseinbußen bemerkbar machen.

Abbildung 4.13: Layout Mikrotiterplatten



Die Reaktion wurde durch Zugabe einer für jedes well identischen Menge Protease gestartet. Das zuzugebende Volumen Proteaselösung wurde anhand einer vorausgehenden Aktivitätsbestimmung der rekombinant hergestellten Protease gewählt und lag zwischen 1 und 10 μl .

Da die Protease manuell nicht in jedes well gleichzeitig zugegeben werden kann, entstehen durch die zeitliche Disparität des Reaktionsstartes geringfügige Verzerrungen der Messpunkte. Diese Verzerrungen wurden mit automatischen Pipetten und einer Zugabe von Protease, getrennt nach Inhibitor, beginnend bei der höchsten Inhibitorkonzentration, entgegengewirkt. Langfristig wird der Einsatz von Pipettiermaschinen erwogen.

4.5.3 ERSTELLUNG VON EDANS EICKURVEN

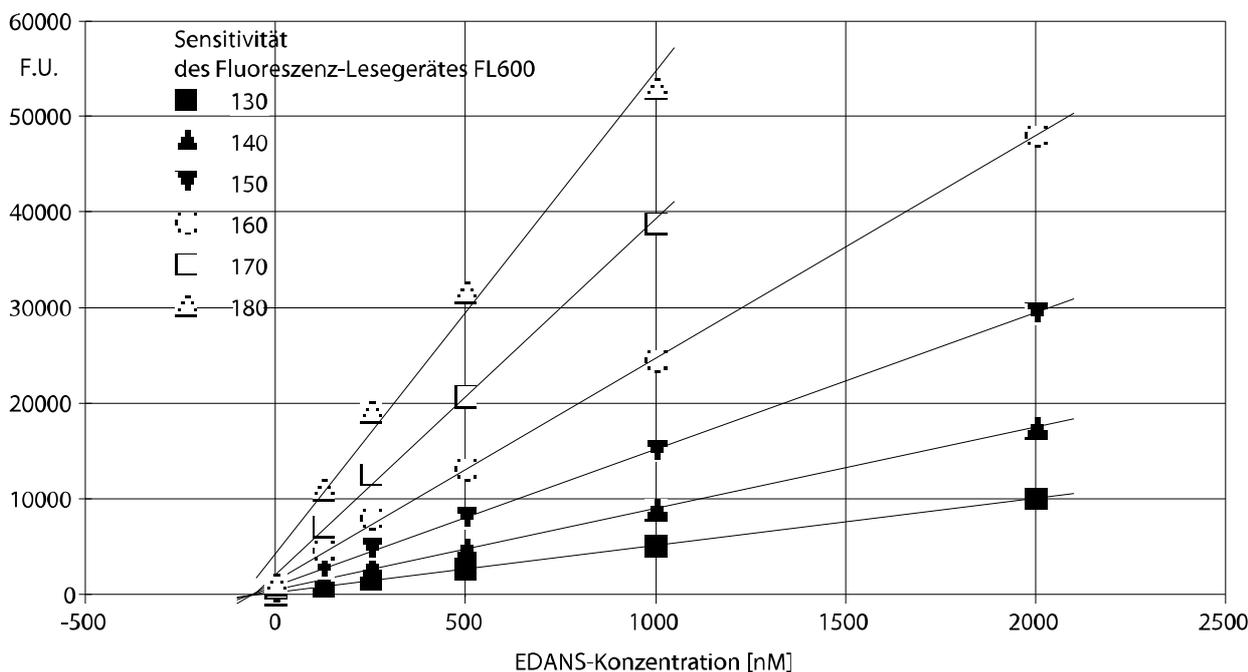
Zur Umrechnung des vom Gerät in proprietären Fluoreszenzeinheiten (F.U.) angegebenen Substratumsatzes in nmol/min wurden EDANS-Eichkurven erstellt. Um das Milieu des Assays möglichst exakt zu simulieren, wurde in Gegenwart von 10 μM Substrat gemessen. Entsprechend der maximal zu erwartenden Spaltproduktkonzentration wurde eine Maximalkonzentration von 2000 nM EDANS eingesetzt. Die Eichkurven hängen von der für die Messung verwendeten Sensitivität des Fluoreszenz-Lesegerätes ab.

Dividiert man den Substratumsatz der Messkurven in F.U./min durch die Steigung der Eichgeraden, erhält man den Stoffumsatz in nM/min. Für die Kalkulation der Resistenzfaktoren ist es allerdings gleichgültig, ob F.U./min oder nM/min als Einheit verwendet werden. Die Einheit kürzt sich bei der Bildung des Quotienten $\frac{v_i}{v_0}$ ohnehin aus der Rechnung heraus.

Tabelle 4.11: Steigung der EDANS-Eichgerade

	Sensitivität des Fluoreszenz-Lesegerätes [proprietäre Einheiten]					
	130	140	150	160	170	180
Steigung EDANS-Eichgerade	4,485	7,765	13,13	21,45	32,94	48,72

Abbildung 4.14: EDANS Eichgeraden



4.6 BERECHNUNG DER RESISTENZFAKTOREN

Aus den im Fluoreszenzassay gemessenen Substratumsatzgeschwindigkeiten können über ein Rechenmodell und nicht lineare Regressionsanalyse die Inhibitionskonstanten (K_i) gegenüber den einzelnen Inhibitoren errechnet werden. Aus dem Vergleich mit den Inhibitionskonstanten des Wildtyps werden Resistenzfaktoren gebildet.

Das Rechenmodell baut auf Erkenntnissen der Enzymkinetik reversibler kompetitiver Inhibitoren auf, zu denen die peptidomimetischen Inhibitoren der HIV-Protease zählen.

4.6.1 KINETIK KOMPETITIVER INHIBITOREN

Die Enzymkinetik kompetitiver Inhibitoren wird bei konstanter Enzymmenge im Wesentlichen von den folgenden Faktoren bestimmt:

- **Isosterie:** den Konzentrationen von Substrat [S] und Inhibitor [I]

- **Allosterie:** der Affinität zum Inhibitor (definiert durch die Inhibitionskonstante K_i) bzw. zum Substrat (definiert durch die sog. Michaelis-Menten-Konstante K_m)
- Der **Geschwindigkeit**, mit der sich die durch K_i und K_m beschriebenen Gleichgewichte zwischen den Komplexen aus Enzym, Inhibitor und Substrat einstellen.

Exkurs 2: Inhibitorclassen in Stichpunkten

Grundsätzlich werden 2 Archetypen von Inhibitoren unterschieden:

Allosterische Inhibitoren	Kompetitive Inhibitoren	
<ul style="list-style-type: none"> • binden nicht am aktiven Zentrum des Enzyms • bewirken durch Konformationsänderungen eine Veränderung der Enzymfunktion • werden in ihrer Wirkung durch die Konzentration des natürlichen Substrates nicht beeinflusst. 	<ul style="list-style-type: none"> • binden am aktiven Zentrum des Enzyms • konkurrieren dort mit dem natürlichen Substrat • werden in ihrer Wirkung durch die Konzentration des natürlichen Substrates beeinflusst. 	
	<p>irreversible Inhibitoren</p> <ul style="list-style-type: none"> • kovalente Bindung [ES] 	<p>reversible Inhibitoren</p> <ul style="list-style-type: none"> • nicht kovalente Bindung [ES] <ul style="list-style-type: none"> • klassisch • fest-bindend • langsam-bindend • langsam, fest-bindend

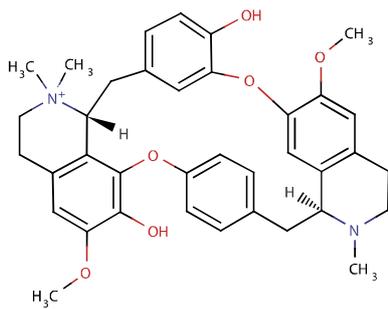
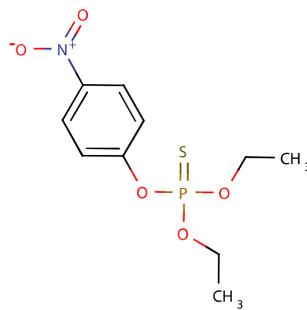
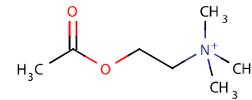
Kompetitive Inhibitoren können nach ihrem Bindungsverhalten weiter in irreversible und reversible Inhibitoren gegliedert werden: bei irreversiblen Inhibitoren kommt es im Extremfall durch eine kovalente Bindung zur dauerhaften Inaktivierung des Enzyms. Reversible Inhibitoren binden nicht kovalent, lassen sich (z.B. vom Substrat) vom aktiven Zentrum verdrängen.

Peptidomimetische Inhibitoren der HIV-Protease zählen zu den reversiblen kompetitiven Inhibitoren. Untergliederung der reversiblen Inhibitoren nach Morrison (Morrison 1982).

4.6.1.1 ISOSTERIE: DIE KONZENTRATIONEN VON INHIBITOR UND SUBSTRAT

Im Gegensatz zur allosterischen Inhibition (Exkurs 2), sind bei der klassischen reversiblen kompetitiven Hemmung die Konzentrationsverhältnisse von Inhibitor zu Substrat von entscheidender Bedeutung.

Bei starkem Inhibitorüberschuss wird kaum Substrat umgesetzt. Der Großteil des Enzyms liegt als Enzym-Inhibitor-Komplex [EI] vor und ist dadurch inaktiviert. Überwiegt das Substrat, ist die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Enzym und Inhibitor geringer, als das Zusammentreffen von Enzym und Substrat. Es gibt mehr Enzym-Substrat-Komplexe [ES], als [EI]-Komplexe. Der Substratumsatz wird nur leicht gemindert. Im Extremfall kann die Wirkung des Inhibitors sogar aufgehoben werden (Exkurs 3 Seite 58).

Exkurs 3: Tubocuranin als prominentes Beispiel eines kompetitiven Hemmstoffes.**Tubocuranin****Parathion****Acetylcholin**

Prominentes Beispiel einer kompetitiven Hemmung ist das aus der Rinde von *Chondrodendron tomentosum* gewonnene Tubocuranin. Tubocuranin wurde u. a. von südamerikanischen Indianern als Pfeilgift (Curare) und in der Chirurgie als Muskelrelaxans eingesetzt. Es handelt sich um einen kompetitiven Hemmstoff des postsynaptischen, nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors.

Antidot ist Parathion, ein Hemmstoff der Cholinesterase. In Gegenwart von Parathion steigt die Konzentration von ACh im Verhältnis zur Tubocuraninkonzentration stark an. Tubocuranin wird zu Gunsten des natürlichen Agonisten ACh vom Rezeptor verdrängt. Die Blockierung des Rezeptors ist aufgehoben.

Die Strukturdaten wurden über ChemIDplus Advanced⁸⁴ der SIS⁸⁵ der NLM⁸⁶ mit Hilfe des Javaapplets *Marvin*⁸⁷ bezogen.

Unter den Bedingungen unseres Assays ist das Substrat ($c=10\ \mu\text{M}$) gegenüber Enzym ($c \approx 2\text{-}10\ \text{nM}$) und Inhibitor ($c=0\text{-}20\ \text{nM}$) stark im Überschuss. Trotzdem wird die Wirkung der Proteaseinhibitoren durch den Substratüberschuss nicht neutralisiert. Die peptidomimetischen Inhibitoren der HIV-Protease zählen nämlich zu den **festbindenden** kompetitiven Inhibitoren und verhalten sich somit ähnlich wie irreversible kompetitive Inhibitoren. Wurde der Inhibitor im aktiven Zentrum gebunden, löst er sich nur sehr langsam wieder davon ab: so langsam, dass der Zerfall des Enzym-Inhibitor-Komplexes im Beobachtungszeitraum des Assays praktisch keine Rolle spielt. Im Unterschied zur irreversiblen kompetitiven Hemmung wird der Inhibitor jedoch nicht kovalent gebunden. Entscheidend für die Kinetik ist bei diesem Inhibitortypus weniger das Verhältnis von Inhibitor zu Substrat, als viel mehr das Verhältnis von Enzym zur so genannten Inhibitionskonstanten K_i des Inhibitors (Kapitel 4.6.2), die im folgenden Abschnitt vorgestellt wird. Während klassische kompetitive Inhibitoren ihre Wirkung meist erst entfalten, wenn die Inhibitor-Konzentration die Enzymkonzentration um ein Vielfaches⁸⁸ übersteigt, wirken fest-bindende Inhibitoren, wie die der HIV-Protease, schon bei äquimolaren Konzentrationen.

4.6.1.2 ALLOSTERIE

Unter Allosterie wird u. a. die Intensität der Bindung zwischen Enzym und Substrat, respektive Enzym und Inhibitor, subsumiert. Die Stabilität des Komplexes aus Enzym und Inhibitor, sowie des

⁸⁴Umfangreiche Datenbank zu chemischen Substanzen mit dem Schwerpunkt auf medizinischen Wirkstoffen. Teil der *Specialized Information Services* der NLM (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

⁸⁵*Specialized Information Services* der *National Library of Medicine*, USA (<http://sis.nlm.nih.gov>)

⁸⁶*National Library of Medicine* der *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA (<http://www.nlm.nih.gov/>)

⁸⁷Javaapplet der Firma Chemaxon® zur Visualisierung chemischer Strukturformeln. (<http://www.chemaxon.com/marvin/>)

⁸⁸typisches Beispiel $10^{-5}\ \text{M}$ Inhibitor und $10^{-9}\ \text{M}$ Enzym, also ein Überschuss um den Faktor 1000 (Bieth 1995).

Komplexes aus Enzym und Substrat, wird durch die Inhibitionskonstante K_i bzw. die Michaelis-Menten-Konstante K_m ausgedrückt.

4.6.1.2.1 INHIBITIONSKONSTANTE (K_i) UND MICHAELIS-MENTEN-KONSTANTE (K_m)

Die Stabilität der Enzym-Inhibitor-Komplexes, die Festigkeit der Bindung zwischen Enzym und Inhibitor, wird durch seine Dissoziationskonstante, die so genannte Inhibitionskonstante K_i , beschrieben. Je kleiner K_i , desto höher die Affinität.

Formel 4.1: Die Inhibitionskonstante K_i

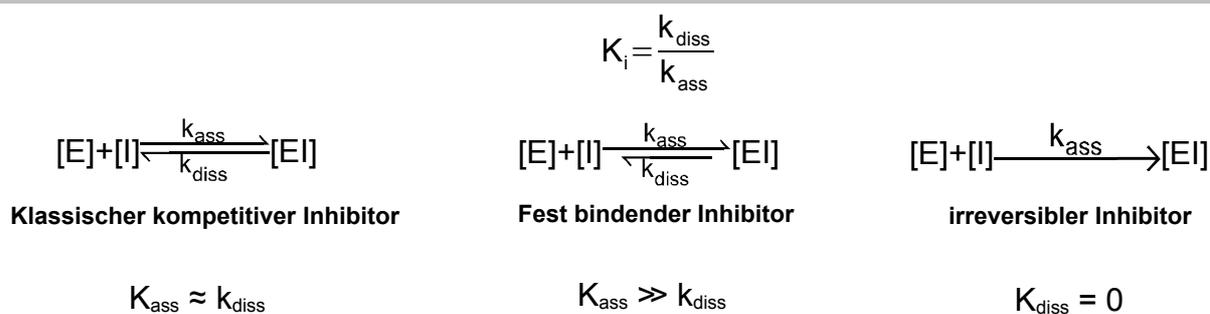
$$K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$$

K_i	=	Inhibitionskonstante
$[E]$	=	Enzymkonzentration
$[I]$	=	Inhibitorkonzentration
$[EI]$	=	Konzentration des Ezym-Inhibitor Komplexes

Genau genommen besteht K_i aus 2 Konstanten: Der Gleichgewichtskonstanten k_{ass} für die **Formung (Assimilation) des Enzym-Inhibitor-Komplexes [EI]** und der Gleichgewichtskonstanten für den **Zerfall (Dissoziation) des Enzym-Inhibitor-Komplexes [EI]** in Enzym [E] und Inhibitor [I] k_{diss} .

Bei klassischen, kompetitiven Inhibitoren halten sich k_{ass} und k_{diss} in etwa die Waage. Irreversible Inhibitoren binden im Extremfall kovalent an das Enzym, sodass es nicht mehr zu einem spontanen Zerfall kommt: $k_{\text{diss}} = 0$. Die Proteaseinhibitoren nehmen als festbindende Inhibitoren eine Mittelstellung ein. Es bilden sich deutlich mehr Enzym-Inhibitor-Komplexe, als zerfallen: $k_{\text{ass}} \gg k_{\text{diss}}$.

Abbildung 4.15: Die Inhibitionskonstante K_i besteht aus k_{ass} und k_{diss}



Analog zu K_i ist die so genannte Michaelis-Menten-Konstante K_m ein Maß für die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes [ES]. Tabelle 4.12 vergleicht K_i und K_m und ordnet ihnen ihre anschauliche Bedeutung zu.

Die Konstanten K_i und K_m sind charakteristische **unveränderliche Eigenschaften** des jeweiligen Enzyms. Ihr Wert ist als **Kenngroße** unabhängig vom eingesetzten Bestimmungsverfahren. K_i ist deshalb gut als objektives Maß der Resistenz eines Enzyms gegenüber dem Inhibitor geeignet.

Tabelle 4.12: K_i und K_m im Vergleich

K_i	K_m
$[S] + [EI] \xrightleftharpoons{K_i} [I] + [E] + [S] \xrightleftharpoons{K_m} [ES] + [I]$	
Inhibitionskonstante	Michaelis-Menten-Konstante
Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes [EI]	Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes [ES]
$K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]} = \frac{k_{\text{diss}[EI]}}{K_{\text{ass}[EI]}}$	$K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_{\text{diss}[ES]}}{K_{\text{ass}[ES]}}$
Inhibitorkonzentration [meist nM]	Substratkonzentration [meist nM]
<ul style="list-style-type: none"> für halbmaximale Inhibition bei der 50 % des Enzyms als Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegt. 	<ul style="list-style-type: none"> für halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der 50 % des Enzyms als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt
Maß für die	Maß für die
<ul style="list-style-type: none"> Stabilität des Enzym-Inhibitor-Komplexes Affinität des Enzyms zum Inhibitor 	<ul style="list-style-type: none"> Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes Affinität des Enzyms zum Substrat
Je kleiner der Wert, desto höher die Affinität	

In Anlehnung an Darstellungen aus einem Vorlesungsskript von Prof. Dr. Roland Scholz, Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

4.6.1.2.2 DIE SCHEINBARE INHIBITIONSKONSTANTE $K_{i(\text{APP})}$

Die im Assay beobachtete Größe ist allerdings nicht K_i , sondern $K_{i(\text{app})}$. Die von der Substratkonzentration abhängige scheinbare Inhibitionskonstante. K_i steht mit $K_{i(\text{app})}$ in folgendem Zusammenhang:

Formel 4.2: Scheinbare Inhibitionskonstante $K_{i(\text{app})}$

$$K_{i(\text{app})} = K_i \left(\frac{1 + [S]}{K_m} \right)$$

$K_{i(\text{app})}$ scheinbare Inhibitionskonstante
 K_i Inhibitionskonstante
 K_m Michaelis-Menten-Konstante

Wenn Substrat und Inhibitor an derselben Stelle des Enzyms binden und sich Enzym, Substrat und Inhibitor mit ihren Komplexen in einem echten Equilibrium befinden, sind K_i und $K_{i(\text{app})}$ näherungsweise identisch (Bieth 1995). **Da diese Bedingungen im Fluoreszenzassay mit akzeptabler Approximation erfüllt sind, werden K_i und $K_{i(\text{app})}$ im Folgenden synonym gebraucht.**

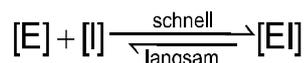
Die beobachtete apparente Inhibitionskonstante $K_{i(\text{app})}$ kann also, wie K_i selbst, als Maß für die Hemmung der HIV-Protease durch den Inhibitor verwendet werden. Der Vergleich mit der Wildtyp-Protease erlaubt die Berechnung von Resistenzfaktoren.

K_i definiert zwar die Lage des Gleichgewichts zwischen Enzym, Inhibitor und dem Enzym-Inhibitor-Komplex, macht jedoch keine Angaben über die – nicht minder bedeutsame – Geschwindigkeit, mit der sich dieses Gleichgewicht einstellt.

4.6.1.3 BINDUNGSKINETIK

Die medikamentös verwendeten peptidomimetischen Inhibitoren binden sich schnell an das aktive Zentrum der Protease und diffundieren nur langsam wieder ab.

Formel 4.3: Kinetik festbindender reversibler Inhibitoren.



[E] Enzymkonzentration
 [I] Inhibitorkonzentration
 [EI] Konzentration Enzym-Inhibitor-Komplex

Obwohl es sich um kompetitive Inhibitoren handelt, ähnelt die Kinetik der eines irreversiblen Inhibitors. Man spricht deshalb auch von **festbindenden** kompetitiven Inhibitoren.

Nach Morrison (Morrison 1982) lassen sich Inhibitoren, die in Abbildung 4.15 alleine nach der Lage des Gleichgewichtes zwischen [EI], [E] und [I] klassifiziert wurden, unter Einbeziehung der Geschwindigkeit, mit der sich das jeweilige Gleichgewicht einstellt, wie folgt einteilen:

Tabelle 4.13: Klassifikation reversibler Enzyminhibitoren nach Morrison

Inhibitorklasse	Konzentrationsverhältnis zw. Enzym und Inhibitor	Reaktionsgeschwindigkeit zw. [E], [I] und [EI]
klassisch	$[I] \gg [E]$	sehr langsam
fest-bindend	$[I] \cong [E]$	schnell
langsam-bindend	$[I] \gg [E]$	langsam
langsam, fest-bindend	$[I] \cong [E]$	langsam

Nach Morrison (Morrison 1982).

Für das Bindeverhalten des Inhibitorstypus der festbindenden Inhibitoren, welchen auch die Inhibitoren der HIV-Protease angehören, ist das Verhältnis von $\frac{[E]}{K_i}$ von besonderer Bedeutung:

4.6.2 DIE BESONDERE BEDEUTUNG DES QUOTIENTEN E/K_i

Im Gegensatz zu klassischen kompetitiven Inhibitoren, die Ihre Wirkung erst entfalten, wenn die Inhibitorkonzentration die Enzymkonzentration um ein Vielfaches⁸⁹ übersteigt, wirken fest-bindende Inhibitoren schon bei äquimolaren Konzentrationen. Ihre Kinetik wird stark vom Verhältnis $\frac{[E]}{K_i}$ beeinflusst (Bieth 1995). Auf die besondere Bedeutung dieses Quotienten für enzymkinetische Messungen wird in Kapitel 5.3.1 (Seite 75) detailliert eingegangen.

⁸⁹typisches Beispiel 10^{-5} M Inhibitor und 10^{-8} M Enzym, also ein Überschuss um den Faktor 1000 (Bieth 1995).

4.6.3 DAS RECHENMODELL

Die Kinetik peptidomimetischer HIV-Proteaseinhibitoren lässt sich, wenn der Inhibitor bei $\frac{[E]}{K_i} \approx 1$ etwa zu gleichen Teilen frei und an Enzym gebunden ist, mit der allgemeinen Gleichung für festbindende, kompetitive, reversible Inhibitoren beschreiben:

Formel 4.4: Allgemeine Gleichung für kompetitive, reversible, festbindende Inhibitoren

$$\frac{v_i}{v_o} = 1 - \frac{([E]_T + [I]_T + K_{i(app)}) - \{([E]_T + [I]_T + K_{i(app)})^2 - 4[E]_T[I]_T\}^{\frac{1}{2}}}{2[E]_T}$$

v_i	Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Anwesenheit von Inhibitor
v_o	Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Abwesenheit von Inhibitor
$[E]_T$	Gesamtkonzentration des aktiven Enzyms
$[I]_T$	Gesamtkonzentration des freien und gebundenen Inhibitors

Nach Bieth und Morrison (Bieth 1995; Morrison 1982).

Wenn bei starkem Enzymüberschuss $\frac{[E]}{K_i} \geq 100$, unter so genannten Titrationsbedingungen, der Inhibitor fast komplett an Enzym gebunden ist, vereinfacht sich Formel 4.4 näherungsweise zu

Formel 4.5: Kinetik festbindender Inhibitoren unter Titrationsbedingungen

$$\frac{v_i}{v_o} \approx 1 - \frac{[I]_T}{[E]_T}$$

Nach Bieth (Bieth 1995)

Bei sehr geringen Enzymmengen $\frac{E}{K_i} \leq 0,01$ geht die allgemeine Gleichung für festbindende Inhibitoren (Formel 4.4) in die Gleichung für klassische Inhibition über:

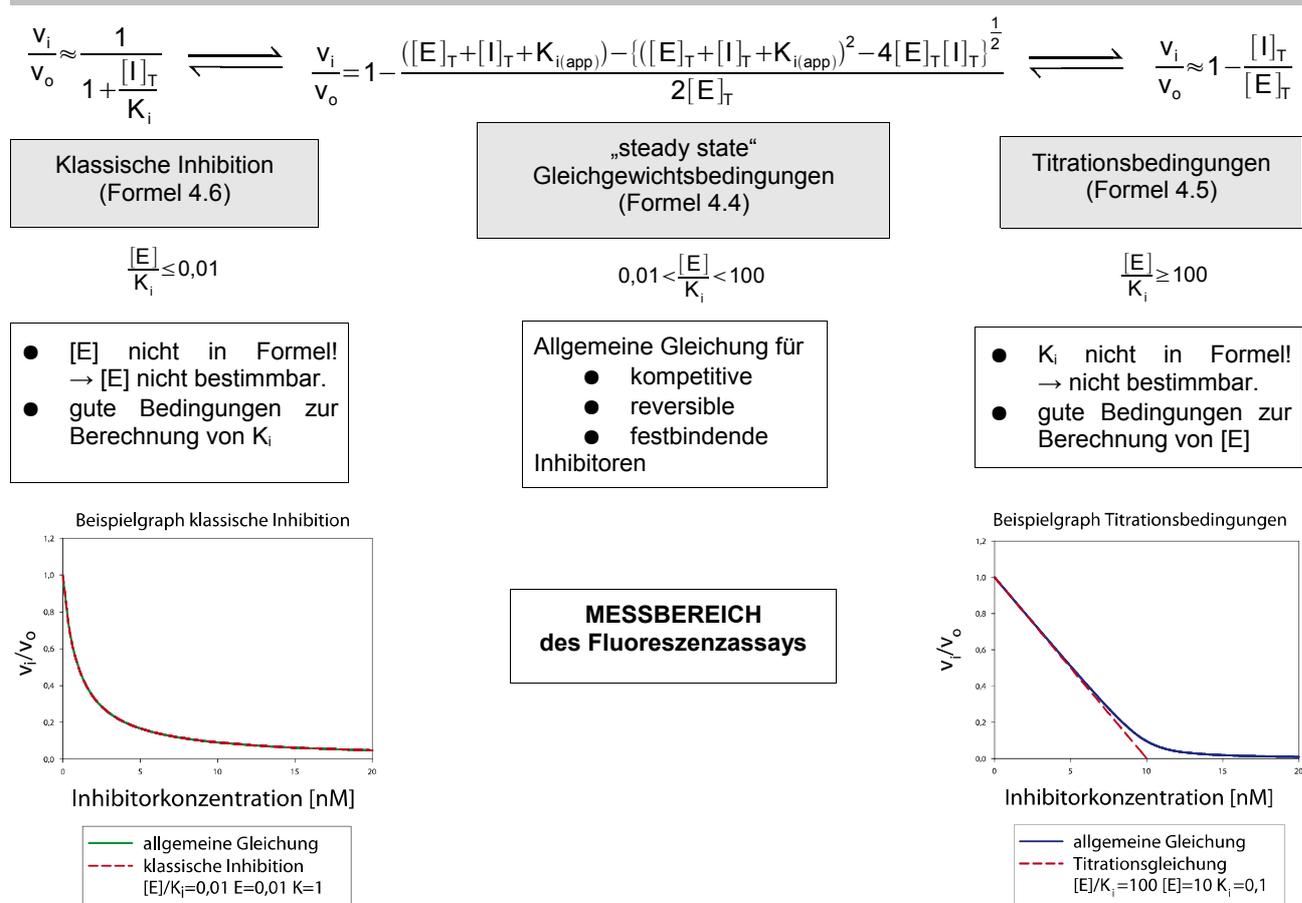
Formel 4.6: Kinetik klassischer Inhibitoren

$$\frac{v_i}{v_o} \approx \frac{1}{1 + \frac{[I]_T}{K_i}}$$

Nach Bieth (Bieth 1995)

Die Übergänge zwischen den beschriebenen Extremen sind fließend:

Abbildung 4.16: Überblick über das Rechenmodell



Formeln nach Bieth (Bieth 1995). Beispielgraphen wurden mit *SigmaPlot* generiert.

4.6.4 DIE INHIBITIONSKONSTANTE K_i ALS MASS DER RESISTENZ

In dem am Max von Pettenkofer-Institut entwickelten Assay ist die Inhibitionskonstante K_i Maß der Resistenz einer Protease gegenüber dem Inhibitor. K_i ist als feste Stoffeigenschaft eine unabhängige Größe, die nicht vom eingesetzten Testverfahren abhängt. Als Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes drückt sie aus, wie stark das aktive Zentrum durch den Inhibitor blockiert werden kann. Durch Vergleich mit den K_i -Werten des Wildtyps werden über den Quotienten $\frac{K_{i\text{Patient}}}{K_{i\text{Wildtyp}}}$ Resistenzfaktoren berechnet.

Die Inhibitionskonstante K_i kann unter Anwendung von Formel 4.4 mit nicht linearer Regressionsanalyse berechnet werden. Für diese Berechnung von K_i nach Formel 4.4 müssen folgende Parameter möglichst exakt bekannt sein:

- v_i , die Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Anwesenheit einer bestimmten Inhibitor-konzentration (F.U./min oder nM/min)
- v_o , die Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Abwesenheit von Inhibitor
- E , die Konzentration des aktiven freien und komplexierten Enzyms
- I , die Gesamtkonzentration des freien und komplexierten Inhibitors.

Die Geschwindigkeiten des Substratumsatzes v_i und v_o sind die Messgrößen des Fluoreszenzassays. Die Inhibitorkonzentration ist durch das Layout der Mikrotiterplatte vorgegeben. Problematisch ist die Konzentration aktiven Enzyms. Sie muss meistens als 2. Variable neben K_i in der Gleichung belassen werden (siehe Kapitel 5.4.1.2.3 Seite 88).

4.6.5 NICHT LINEARE REGRESSIONSANALYSE

Nicht lineare Regression beruht auf der Methode der größten Wahrscheinlichkeit (engl. *maximum likelihood method*). Es wird versucht, die Parameter einer bekannten Gleichung zu finden, die am wahrscheinlichsten zur Entstehung eines gemessenen Datensatzes geführt haben. Mit anderen Worten: Der Graph einer Gleichung wird so genau wie möglich an einen Messdatensatz angepasst (engl. *fitted*). Dazu wird – wie auch bei linearer Regression – unter der Annahme einer gaußschen Normalverteilung der Messdaten auf die Methode der kleinsten Quadrate zurückgegriffen. Das Prinzipielle iterative Vorgehen ist wie folgt: Zunächst werden Schätzwerte in die Gleichung eingesetzt, und die Resultate mit den real gemessenen Werten verglichen. Die vertikalen Differenzen zu den tatsächlichen Punkten werden quadriert und aufsummiert. Diese Quadratsumme (engl. *sum-of-squares*) dient als Maß für die Güte der Schätzung. Mit Hilfe spezieller Algorithmen werden die Schätzungen der Gleichungsparameter immer wieder verfeinert. Dabei wird versucht, die Quadratsummen zu minimieren. Ist keine signifikante Verminderung der Quadratsummen mehr zu erzielen, hat man die bestmögliche Annäherung (engl. *best fit*) erreicht.

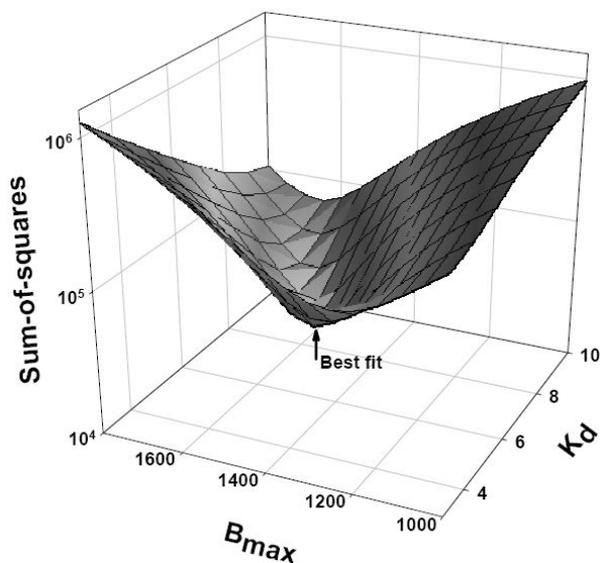
Abbildung 4.17: Beispiel einer nichtlinearen Regressionsanalyse

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_d + X}$$

In diesem Beispiel sollen diejenigen Parameter B_{\max} und K_d aus obiger Gleichung gefunden werden, die einen Datensatz am wahrscheinlichsten verursacht haben. Der Graph der Gleichung wird also an die Messdaten so gut wie möglich angepasst („gefittet“).

Die Abbildung rechts zeigt die jeweilige Quadratsumme (engl. *sum of squares*) in Abhängigkeit von B_{\max} (1000-1700) und K_d (3-10) als gewölbte Fläche. In etwa bei $B_{\max}=1400$ und $K_d=6$ erreichen die *sum-of-squares* ein Minimum, den so genannten *best fit*. Diese Parameter werden als Lösung ausgegeben. Die Graphen der Gleichung sind in dieser Abbildung **nicht** dargestellt.

Mit *multipler Regression* (engl. *multiple regression*) können auch mehr als 2 Unbekannte einer Gleichung oder eines Gleichungs-systems berechnet werden.



Darstellung aus dem Begleitbuch zur Regressionssoftware KC4 (Motulsky, Christopoulos 2003).

Prominente Algorithmen für Schätzwerte, die möglichst kleine Quadratsummen generieren, sind die Methode des steilsten Abstieges (engl. *method of steepest descent*) und die Gauß-Newton-Me-

thode. Die für diesen Assay angewandte Methode nach Levenberg-Marquardt kombiniert beide Verfahren in einem gemeinsamen Algorithmus (Marquardt 1963).

4.6.5.1 VORTEILE NICHT LINEARER REGRESSIONSANALYSE

Lineare Regressionsanalysen sind wesentlich anschaulicher und einfacher durchzuführen, als nicht lineare, die praktisch nur unter Einsatz eines Computers möglich sind. Nichtlineare Regression ist im Detail ohne Spezialkenntnisse in Statistik und höherer Mathematik nur schwer nachvollziehbar. In der Vergangenheit wurde daher versucht, nicht lineare Daten über eine Änderung der Skalierung von Ordinate und Abszisse (sog. *Transformation*: Darstellung nach Lineweaver-Burk, Easson-Stedman, Scatchard und anderen) in lineare zu überführen, um dann die Lösung über lineare Regression herbeizuführen. Diese Transformation der Messdaten verletzt jedoch mehrere Axiome der linearen Regression. Unter anderem durch

1. Verzerrung des Messfehlers. Verletzung des Axioms der Gleichverteilung des Fehlers innerhalb der Messdaten.
2. Veränderung der Beziehung zwischen x und y. Verletzung des Axioms, dass die Variabilität nur in y liegt, während x exakt bekannt ist. Dieser Fehler wirkt sich im Falle des Assays besonders stark aus, da in die y-Werte zwei unabhängige Messungen eingehen (Quotienten $\frac{v_i}{v_o}$).

Darüber hinaus kumulieren bei einigen Transformationen die Messpunkte „auf einem Fleck“ und erschweren so die lineare Regression.

Es wurde im Rahmen des Assays daher ausschließlich nichtlineare Regression verwendet, die diese Schwierigkeiten umgeht. Auch für die nicht lineare Regression nach dem Marquardt-Levenberg Algorithmus müssen allerdings einige Voraussetzungen erfüllt sein:

- Die Normalverteilung der Messdaten.
- Variabilität der Messpunkte nur in der Ordinate.
- Gleicher statistischer Fehler aller Messdaten.

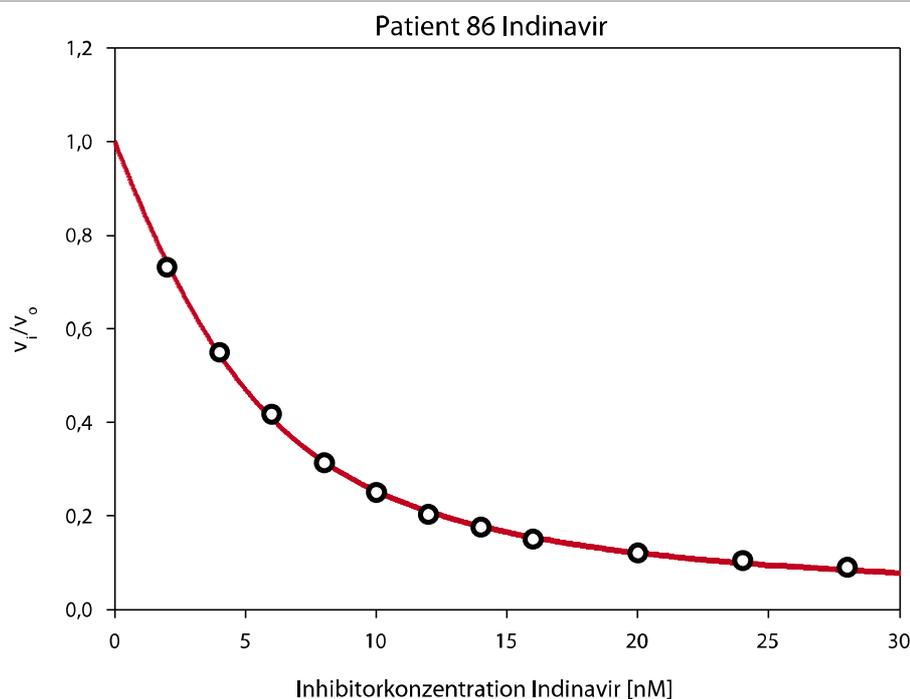
Diese Axiome werden von den Messdaten in den meisten Fällen – zumindest näherungsweise – erfüllt (Kapitel 5.4.1.2.2.3 Seite 87).

4.6.5.2 PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG DER NICHT LINEAREN REGRESSIONSANALYSE

Die nicht linearen Regressionsanalysen wurden mit der Hilfe von Computerprogrammen durchgeführt. *Fig.P* (Biosoft, Camebridge) wurde während dieser Arbeit von den deutlich mächtigeren Programmen *SigmaPlot 8* (Systat Software, Richmond, USA) und *GraphPad Prism 4* (Graphpad, San Diego, USA) abgelöst. Alle genannten Programme arbeiten mit dem Marquardt-Levenberg Algorithmus (Marquardt 1963) und wurden in Bezug auf die berechneten Ergebnisse auf Äquivalenz zueinander überprüft.

Obwohl die Methode der multiplen nicht linearen Regression bereits in den 1980er Jahren in Computerprogramme umgesetzt wurde (Yamaoka et al. 1985), ist sie bis heute nur in wenige Statistikanwendungen integriert⁹⁰ und offenbar seltenen Spezialaufgaben vorbehalten. Für die multiple nicht lineare Regressionsanalyse des weiterentwickelten Rechenmodells kam *SigmaPlot* in der Version 8 zum Einsatz. Nach den Vorgaben des *SigmaPlot 8.0 Programming Guides* (SPSS Inc. 2002) wurde ein Berechnungsvorlage mit der allgemeinen Formel 4.4 eingerichtet. Werden die Eingangsdaten in einem bestimmten Tabellenformat gehalten, erfolgt die Berechnung weitestgehend automatisiert. Für die korrekte Einhaltung des Tabellenformates sorgte die Export-Transformations-Funktion der Software des Fluoreszenzlesegerätes, KC4.

Abbildung 4.18: Beispielgraph nichtlineare Regression



Dieser Graph wurde mit *SigmaPlot 8.0* generiert.

4.6.6 RESISTENZFAKTOREN

Aus den Inhibitionskonstanten K_i wurden über den Vergleich zum Wert des Wildtyps mittels des Quotienten $\frac{K_i, \text{Inhibitor}}{K_i, \text{Wildtyp}}$ Resistenzfaktoren berechnet. Im Gegensatz zur bisher üblichen Praxis, die eine Referenzierung zur jeweiligen, im Assay mitgeführten, Wildtypkontrolle vorsah, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine feste Wildtypreferenz etabliert (Kapitel 5.2 Seite 68) und ein Vorschlag für eine einfache Klassifikation über Grenzwerte (engl. *cutoff*) erarbeitet.

⁹⁰*GraphPad Prism* ist in der Version 4 nach Angaben des Herstellers nicht für multiple nicht lineare Regression geeignet.

5 ERGEBNISSE

5.1 CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN PROTEASEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 Gruppen zu je 3 HIV-Proteasen untersucht:

5.1.1 PROTEASEN MIT GENOTYPISCH NICHT EINDEUTIG KLASSIFIZIERBAREM RESISTENZMUSTER

Die erste Gruppe bilden die Patientenproteasen „73“, „86“ und „174“ aus der virologischen Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes. Anlass für die Einsendung zur genotypischen Testung waren eine klinisch unzureichend wirksame HAART und ein damit verbundenes Ansteigen der Viruslast bzw. ein Absinken der CD4-positiven Zellen.

Diese Proteasen fielen in der genotypischen Resistenzprognose durch ihr nicht eindeutig klassifizierbares Resistenzmuster auf. Die von verschiedenen genotypischen Algorithmen⁹¹ erstellten Prognosen und die Expertenmeinung des befundenden Facharztes divergierten. Solche Zweifelsfälle sind eines der geplanten Einsatzfelder für den am Max von Pettenkofer-Institut entwickelten phänotypischen Resistenzassay. Wie im Methodenteil beschrieben, sind die ersten Schritte von genotypischer Resistenzprognose und phänotypischem Assay angeglichen worden (Abbildung 4.1 Seite 39), so dass ein phänotypischer Assay direkt an archiviertes Material der genotypischen Resistenzprognose anknüpfen kann.

Mithilfe dieser Stichprobe wurde deshalb untersucht, in wie weit der Assay eine Schiedsrichterfunktion bei konträren genotypischen Vorhersagen übernehmen kann. Dazu wurden die mittels zweier etablierter und frei verfügbarer genotypischer Verfahren prognostizierten Resistenzfaktoren mit den Ergebnissen der phänotypischen Bestimmung verglichen.

Gleichzeitig wurde mit diesen Proben ein abgewandeltes Messprotokoll erprobt, das versucht, messtechnischen Schwierigkeiten durch ein optimiertes Layout der Mikrotiterplatten zu begegnen. Die Messdaten sind dadurch deutlich besser regredierbar.

5.1.2 PROTEASEN MIT BEKANNTEM PHÄNOTYPISCHEM TESTERGEBNIS

Eine zweite Gruppe umfasst die Proteasen RV1, RV2 und RV3 aus dem Fundus der Universität Leuven, Belgien. RV2 ist ein auf alle im klinischen Einsatz befindlichen Proteaseinhibitoren empfindliches Enzym, RV3 eine hochresistente Protease. RV1 nimmt eine Mittelstellung ein. Die drei Proteasen repräsentieren somit die in der Praxis gebräuchliche Klassifizierung aus *susceptible*, *intermediate* und *resistant*. Die am oberen und unteren Extrem des möglichen Spektrums resistenter

⁹¹Am Max von Pettenkofer-Institut kommen im Rahmen der genotypischen Resistenzbestimmung die beiden frei über das Internet verfügbaren Prognosesysteme **HIVdb** (<http://hivdb.stanford.edu/>; Rhee et al. 2003; Shafer et al. 1999; Shafer & Deresinski 2000; Shafer et al. 2000) und **geno2pheno** (<http://www.geno2pheno.org>; Beerenwinkel 2003; Beerenwinkel et al. 2003a) in Verbindung mit der Expertenmeinung des befundenden Facharztes zum Einsatz.

Proteasen stehenden Enzyme RV2 und RV3 helfen, den in der Praxis nutzbaren Messbereich des Assays abzuschätzen.

Die Resistenz von RV1, RV2 und RV3 wurde an der Universität Leuven mit einem zellkulturbasier-ten Assay untersucht, einem Vorläufer der heute kommerziell angebotenen phänotypischen Test-verfahren *Antivirogram*[®] (Cohen et al. 2002; Kellam & Larder 1994) der Firma Virco[®] und *Pheno-Sense*[™] der Firma Virologic[®] (Petropoulos et al. 2000). Da RV1, RV2 und RV3 typische Resis-tenzmuster aufweisen, sind in der Literatur⁹² zudem phänotypische Messungen von Proteasen mit identischem Genotyp publiziert. Mit Hilfe dieser Daten wurde die Vergleichbarkeit des am Max von Pettenkofer entwickelten Tests mit etablierten phänotypischen Systemen evaluiert.

5.1.3 WILDTYP-PROTEASEN

Gruppe drei besteht aus repetitiven Aufarbeitungen der Wildtypen *WT899* (Eberle et al. 1995) aus der Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes und *WTLeuven* der Universität Leuven (Belgien) aus dem dort etablierten phänotypischen Assay. Diese Wildtypen wurden in insgesamt 4 verschiedenen Ansätzen von 3 Laboranten aufgearbeitet und vermessen.

Die hierbei gewonnenen Daten bilden, zusammen mit weiteren, der Literatur entnommenen Wer-ten, die Grundlage für eine vorläufige Wildtypreferenz der K_i -Werte.

Eine qualitativ hochwertige Wildtyp-Referenz ist für aussagekräftige Testergebnisse entscheidend, da die Berechnung der Resistenzfaktoren auf dem Vergleich der scheinbaren Inhibitionskonstan-ten K_i mit denen des Wildtyps beruht. Für die Klassifizierung der Testergebnisse in resistent und empfindlich wurde ein technischer Grenzwert (engl. *cutoff*) festgelegt.

Darüber hinaus wurde mit dieser Versuchsreihe die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen und deren Übereinstimmung zu den aus der Literatur bekannten Daten überprüft.

5.2 ETABLIERUNG EINER WILDTYPREFERENZ

Die Resistenzfaktoren entstehen durch den Vergleich der gemessenen K_i -Werte mit der des Wild-typs. Der Vergleich ist über den Quotienten $\frac{K_{i, \text{Patient}}}{K_{i, \text{Wildtyp}}}$ realisiert. Die genaue Bestimmung der K_i des Wildtyps ist daher von zentraler Bedeutung. Da K_i eine feste Eigenschaft eines Enzyms ist, sollte der Wert theoretisch unabhängig von der eingesetzten Messmethode konstant sein.

Abbildung 5.1 (Seite 70) und Tabelle 5.1 (Seite 73) illustrieren die mit verschiedenen Verfahren be-stimmten WT K_i -Werte. Die gezeigten Messergebnisse lassen sich drei Kategorien zuordnen:

1. Werte aus der Literatur.
2. Messungen mit dem am Max von Pettenkofer-Institut entwickelten Fluoreszenzassay nach rekombinanter Herstellung der Protease.

⁹²Publizierte phänotypische Messergebnisse zu klassischen genotypischen Mutationsmustern können komfortabel über ein Webinterface der HIVdb (http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PR_Phenotype.cgi) recherchiert werden.

- Messungen mit dem Fluoreszenzassay von Protease, die in einer *in vitro* Translation hergestellt wurde.

5.2.1 INHIBITIONSKONSTANTEN DER PROTEASE IN DER LITERATUR

Die in der Literatur beschriebenen Werte wurden mit unterschiedlichen Verfahren generiert. Klabe (Klabe et al. 1998) verwendeten einen HPLC⁹³-Assay, wie er ursprünglich auch bei dem am Max von Pettenkofer-Institut entwickelten Testsystem verwendet wurde (Gehring 2001; Gehring et al. 2003). Bei Markgren (Markgren et al. 2000; Markgren et al. 2002) kam, neben einem auf Oberflächenplasmonen-Resonanz⁹⁴ basierendem optischen Biosensor, ein Fluoreszenzassay mit gequenchtem Substrat zum Einsatz, der dem Verfahren des Max von Pettenkofer-Institutes sehr ähnlich ist (Markgren et al. 2000; Nillroth et al. 1997). K_i wurde bei Markgren via nichtlinearer Regression nach einer Formel von Sculley (Sculley et al. 1996; Sculley, M. J., Morrison, J. F. 1986) bestimmt, die Formel 4.4 (Seite 62) verwandt ist. Die von Shuman (Shuman et al. 2004) veröffentlichten Daten sind größtenteils eine Zusammenstellung früherer Ergebnisse der genannten Publikationen. Der K_i -Wert für Lopinavir wurde von Shuman auf der Grundlage von Sham (Sham et al. 1998) erhobener Daten berechnet.

5.2.2 K_i DER WT-PROTEASEN IM FLUORESZENZASSAY DES MVP

Diese Gruppe umfasst 4 Aufarbeitungen des hausinternen Wildtyps *WT899* aus der virologischen Diagnostik und des bis auf eine stumme Mutation identischen *WTleuven* der Universität Leuven, Belgien. Die Messungen sind eine Zusammenstellung von Ergebnissen dieser Arbeit und vorausgehender Publikationen. Ein Teil der Proteasen wurde rekombinant hergestellt, der andere *in vitro* translatiert. Die Messung der Enzymaktivität wurde nicht nur in Mikrotiterplatten, sondern auch in Küvetten gemessen. Eine in Küvetten gemessene Wildtypprotease wurde aufwändig gereinigt, eine andere lediglich einer simplen *one step purification* unterzogen (Hoffmann 2002). Die Messungen sind mit dem Namen des jeweiligen Laboranten bzw. dem Verfahren gekennzeichnet.

Da es sich bei K_i um eine unveränderliche Stoffeigenschaft handelt, ist der Wert unabhängig vom Bestimmungsverfahren.

⁹³engl. *high performance liquid chromatography* (HPLC)

⁹⁴engl. *surface plasmon resonance* (SPR) (Aslan et al. 2005)

Abbildung 5.1: Wildtyp- K_i in verschiedenen Messungen: geringe Variationsbreite

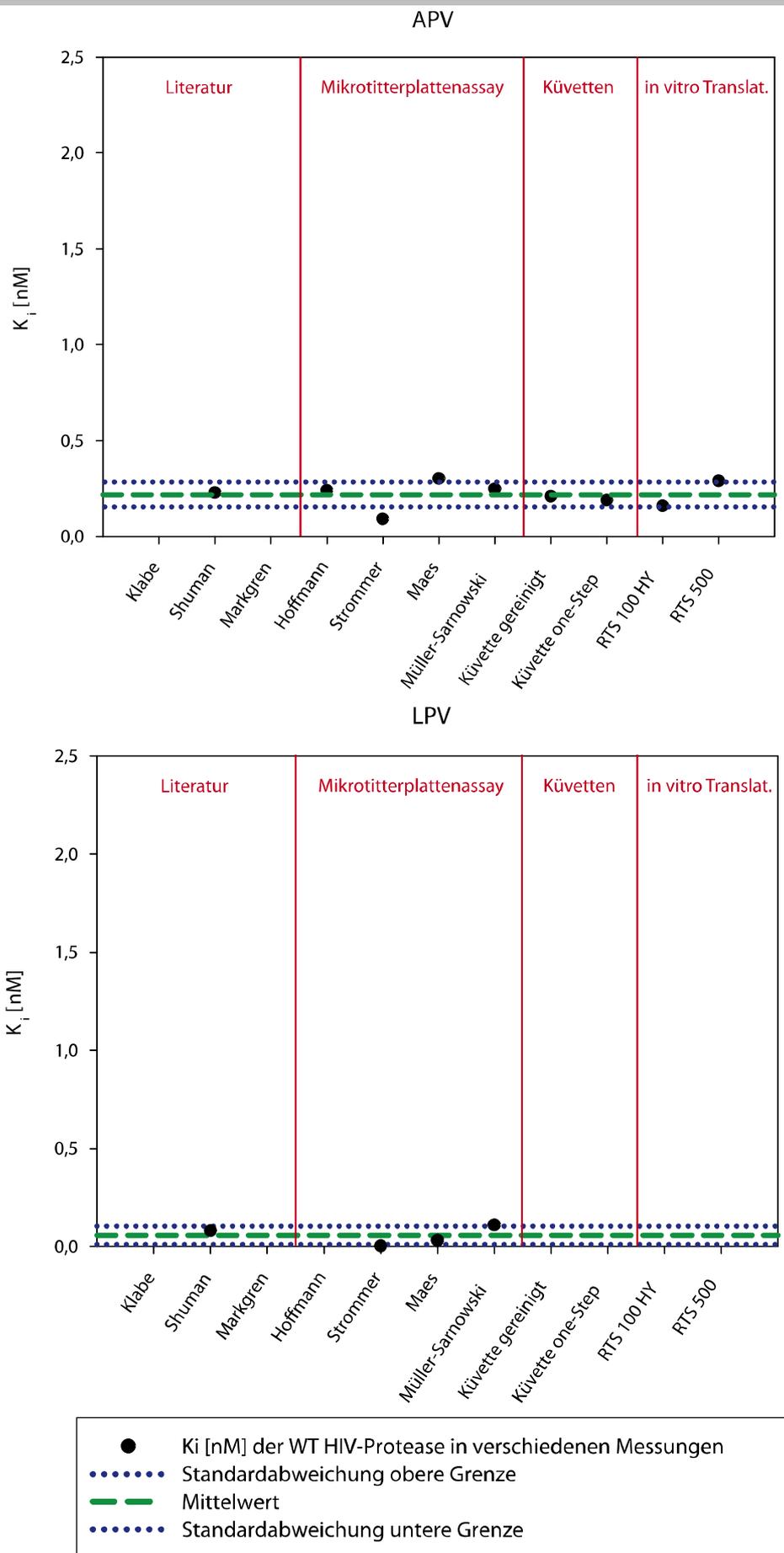


Abbildung 5.2: Wildtyp-K_i in verschiedenen Messungen: Mittlere Variationsbreite

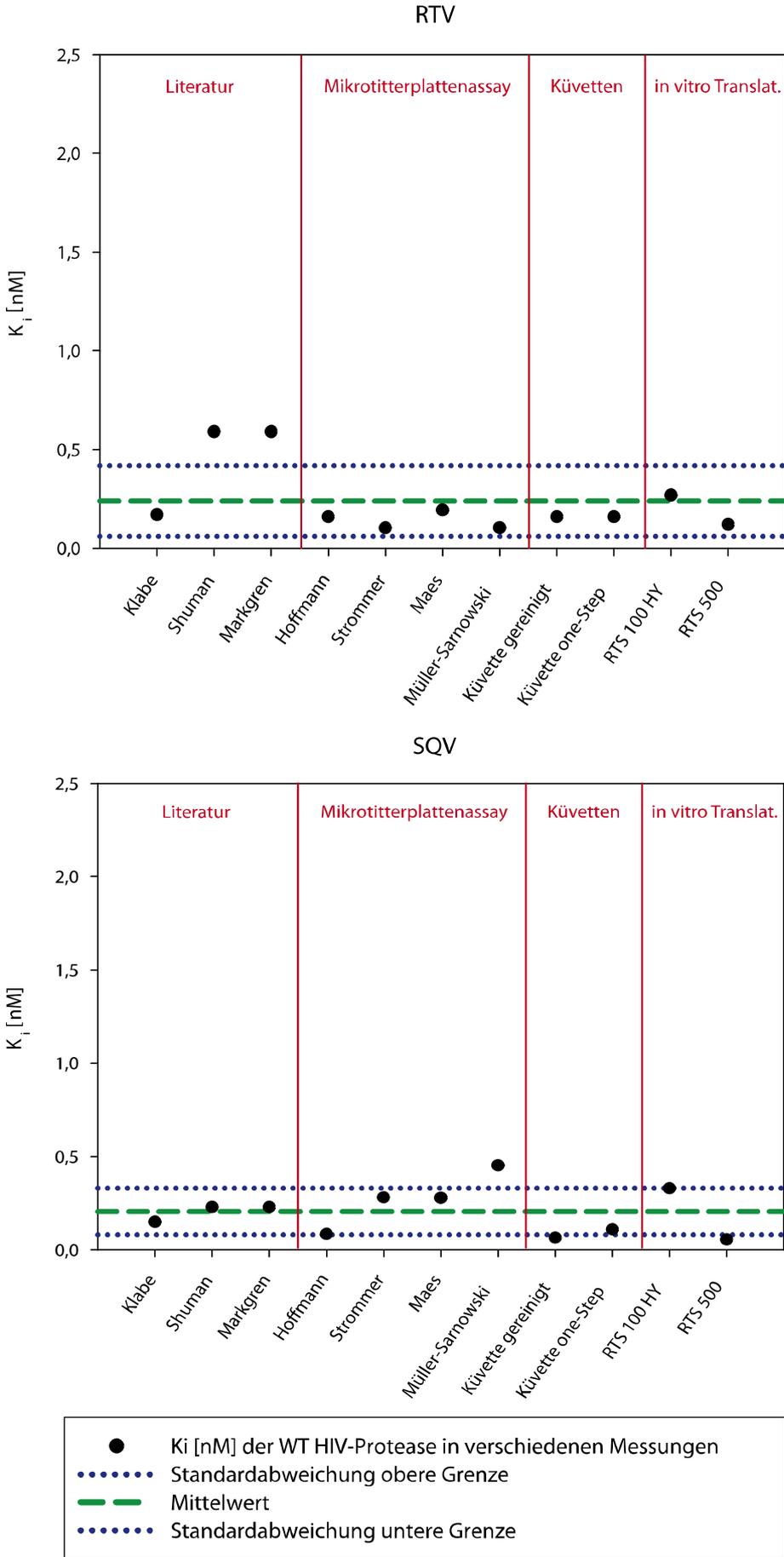
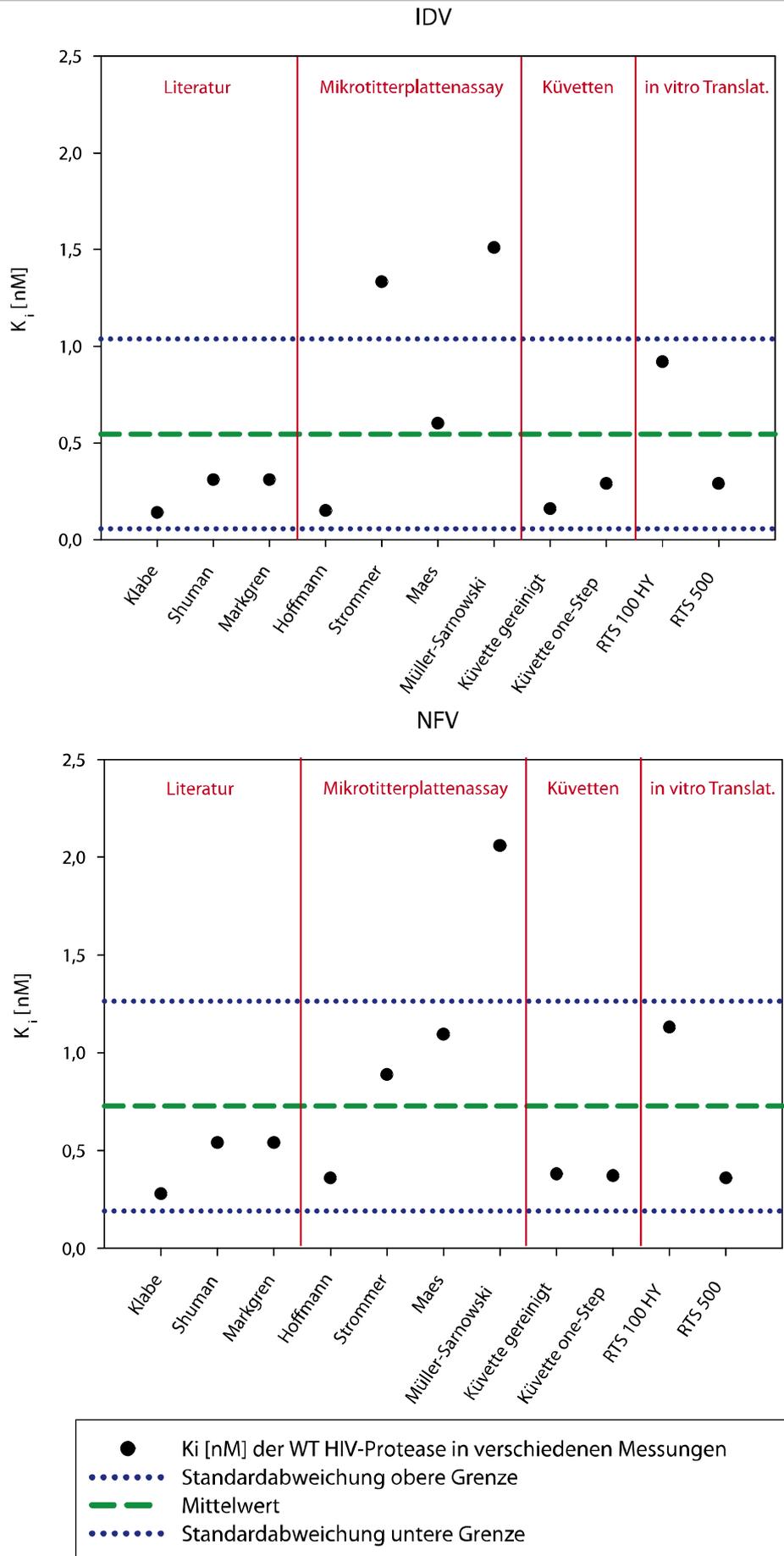


Abbildung 5.3: Wildtyp- K_i in verschiedenen Messungen: Hohe Variationsbreite



5.2.3 REPRODUZIERBARKEIT DER MESSERGEBNISSE

Die Inhibitionskonstanten (K_i) der Inhibitoren Amprenavir, Lopinavir, Ritonavir und Saquinavir zeigen optisch eine gute Übereinstimmung. Die Streubreite der Inhibitoren Indinavir und Nelfinavir scheint zunächst signifikant höher zu liegen.

Bei den zuletzt genannten Inhibitoren fällt auf, dass die der Literatur entnommenen Werte weitgehend mit denen der in vitro hergestellten Protease übereinstimmen, während die Inhibitionskonstanten der rekombinanten Wildtyp-Proteasen etwas höher liegen.

Tabelle 5.1: K_i -Werte WT-Protease in unterschiedlichen Aufarbeitungen und Testsystemen

	APV	IDV	LPV	NFV	RTV	SQV
Durchschnittliche K_i	0,2181	0,5468	0,0564	0,7277	0,2385	0,2067
Standardabweichung (+/-)	0,0649	0,4904	0,0477	0,5374	0,1798	0,1256
Standardabweichung (%)	30 %	90 %	85 %	73 %	75 %	61 %
Standardirrtum (+/-)	0,0216	0,1479	0,0238	0,1620	0,0542	0,0379
95 % Konfidenzintervall	0,0499	0,3295	0,0758	0,3611	0,1208	0,0844
99 % Konfidenzintervall	0,0726	0,4686	0,1390	0,5136	0,1718	0,1200
kleinster K_i -Wert	0,0926	0,1400	3,7000e-3	0,2800	0,1033	0,0570
größter K_i -Wert	0,3021	1,5100	0,1100	2,0600	0,5900	0,4534
n	9	11	4	11	11	11

Eine nüchternere Betrachtung der „nackten Zahlen“ gibt ein etwas anderes Bild: Vergleicht man die relative, prozentuale Standardabweichung und lässt damit einzelne Ausreißer weitgehend unbeachtet, fallen die Unterschiede zwischen den Inhibitoren weniger drastisch aus. Eine Ursache der scheinbar größeren Streubreite von IDV und NFV ist somit der absolut gesehen größere K_i -Wert.

Auch wenn die prozentualen Standardabweichungen zunächst hoch scheinen, ist der enzymatische Test damit durchaus konkurrenzfähig zu den zellkulturbasierten Systemen. Der technische *cutoff* (Exkurs 1, Seite 29) kommerzieller phänotypischer Tests liegt bei einem 2,5 bis 4fachen Anstieg der IC_{50} . Der größte gemessene WT- K_i Wert weicht dagegen bei den bisher generierten Daten nie um mehr als den Faktor 2-3 vom Mittelwert ab (Tabelle 5.1). Die Reproduzierbarkeit scheint somit für einen praktischen Einsatz in der Routinediagnostik ausreichend. Statistisch valide Aussagen sind angesichts der geringen Fallzahl bisher jedoch noch nicht möglich.

Wie in den zellkulturbasierten Tests muss bei jedem Test zwar eine Wildtypkontrolle mitgeführt werden, um die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Testdurchläufen überwachen zu können. Dennoch scheint, bei im Einzelfall durchaus erheblichen Schwankungen⁹⁵, anders als bisher praktiziert eine feststehende Wildtyppräferenz zur Berechnung der Resistenzfaktoren als verlässli-

⁹⁵Bei wiederholter Aufarbeitung der selben Proteasen wurde – unter Anwendung des herkömmlichen Rechenmodells – eine maximale Schwankungsbreite der Resistenzfaktoren um den Faktor 3 beobachtet (Heid 2006).

cher. Eine Referenzierung zum jeweils mitgeführten Wildtyp kann zwar systematische Fehler eliminieren, überträgt aber auch natürliche Schwankungen weiter auf die Testergebnisse. Eine fixe Referenz verbessert dem gegenüber die Vergleichbarkeit verschiedener Testansätze. Das Erkennen systematischer Fehler wird weiterhin durch die jeweils mitgeführte Wildtypkontrolle sicher gestellt.

5.2.4 FESTLEGUNG EINER WILDTPREFERENZ

Die Resistenzfaktoren schwanken, je nach gewählter Wildtypreferenz, erheblich, da sie aus dem Quotienten $\frac{K_i, \text{Patient}}{K_i, \text{WT}}$ berechnet werden. Die WT- K_i -Werte sind, im Vergleich zu denen resistenter Proteasen, relativ klein und nehmen daher starken Einfluss auf die Resistenzfaktoren. Diese Tatsache muss bei der Beurteilung des theoretisch objektiven Wertes „Resistenzfaktor“ unbedingt berücksichtigt werden. Für den geplanten Einsatz in der Routinediagnostik wurde anhand der bisherigen Wildtypmessungen eine vorläufige Wildtypreferenz definiert. Da die relativen Standardabweichungen ähnliche Beträge aufweisen, scheint hierfür der gerundete Mittelwert der bisherigen Messungen zusammen mit Werten aus der Literatur, geeignet:

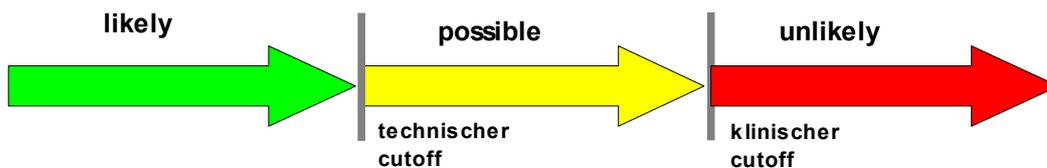
Tabelle 5.2: Vorläufige Referenz Inhibitionskonstanten des Wildtyps

	APV	IDV	LPV	NFV	RTV	SQV
Wildtypreferenz K_i [nM]	0,22	0,55	0,06	0,73	0,24	0,21

5.2.5 FESTLEGUNG EINES TECHNISCHEN SCHWELLENWERTES (CUTOFF)

Damit unmittelbar verbunden ist die Frage nach dem Schwellenwert, ab dem eine Protease als resistent einzustufen ist. Mithilfe solcher Schwellenwerte können, analog zu genotypischen Resistenzprognosen, Klassifikationen gebildet werden, die dem behandelnden Arzt die Interpretation der Testergebnisse erleichtern. Ein schlüssiges Konzept einer einfachen Klassifikation auf Basis der unterschiedlichen cutoff-Werte phänotypischer Resistenztestungen (Exkurs 1, Seite 29) wird von der Firma VIRalliance (Paris, Frankreich) angewandt: Die Wirksamkeit eines Inhibitors, gegen den ein Resistenzfaktor unter dem technischen cutoff vorliegt, wird als wahrscheinlich (engl. *likely*) bezeichnet, bei Resistenzfaktoren zwischen technischem und klinischen cutoff als möglich (engl. *possible*) und über dem klinischen cutoff als unwahrscheinlich (engl. *unlikely*).

Abbildung 5.4: Vorschlag einer Klassifikation für phänotypische Resistenzassays



In Anlehnung an eine Darstellung der Firma VIRalliance (Paris, Frankreich, www.viralliance.com)

Unter Berücksichtigung der beobachteten Schwankungen der Inhibitionskonstanten des Wildtyps (Abbildungen 5.1, Tabelle 5.1) wurde unabhängig vom Inhibitor ein Anstieg des K_i -Wertes um den

Faktor 3 als vorläufiger technischer cutoff gewählt. Dieser Wert muss – wie von den Anbietern zellkulturbasierter Assays praktiziert – kontinuierlich unter Einbeziehung der hinzukommenden WT-Messungen validiert und ggf. aktualisiert werden. Aus den bisher verfügbaren Daten kann nur eine Kategorisierung in empfindlich bzw. resistent abgeleitet werden, da zu biologischem und klinischem cutoff noch keine Erkenntnisse vorliegen.

Wie sich beim Vergleich der Testergebnisse mit denen etablierter genotypischer und phänotypischer Systeme zeigt, bewährt sich der gewählte cutoff auch in der Praxis.

5.3 MESSTECHNISCHE ÜBERLEGUNGEN ZUM RECHENMODELL

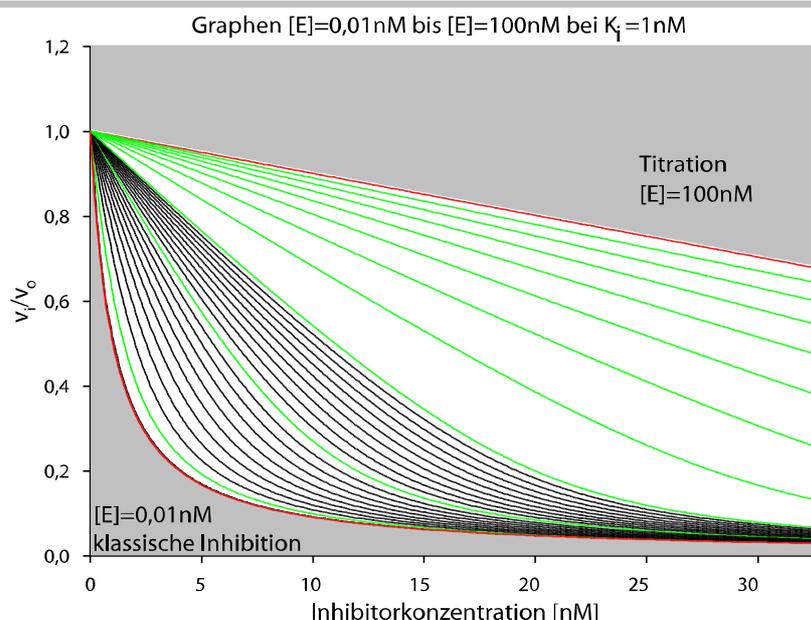
Bereits aus der theoretischen Betrachtung des Rechenmodells können wichtige Schlüsse für die optimalen Messbedingungen des Assays gezogen werden. Konkret führten diese Erkenntnisse über die Umgestaltung des Mikrotiterplattenlayouts zu einer validieren Auswertung der Messergebnisse.

5.3.1 BEDEUTUNG VON $[E]/K_i$ FÜR DEN FLUORESZENZASSAY

Wie im Methodenteil dargestellt, haben reversible, kompetitive, festbindende Inhibitoren, wie die der HIV-Protease, eine besondere Kinetik, für die das Verhältnis der Enzymkonzentration zur Inhibitionskonstanten von entscheidender Bedeutung ist. Diese Beziehung wird deshalb hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Fluoreszenzassay im Folgenden detailliert betrachtet.

5.3.1.1 DIE ENZYMKONZENTRATION $[E]$ BEI KONSTANTEM K_i

Abbildung 5.5: Verhalten des Rechenmodells bei Änderungen in $[E]$ und konstantem K_i



Die Abbildung zeigt eine mit der allgemeinen Formel für reversible, kompetitive, festbindende Inhibitoren (Formel 4.4) generierte Kurvenschar, bei der die Enzymkonzentration $[E]$ zwischen 0,01 nM und 100 nM variiert, während die Inhibitionskonstante K_i bei einem Wert von 1 konstant bleibt. Die Schrittweite zwischen grünen Graphen beträgt 10 nM, zwischen schwarzen Graphen 1 nM. Die äußersten, rot gefärbten, Graphen markieren die Grenzen zu Titrationsbedingungen bzw. klassischer Inhibition nach der Definition von Abbildung 4.16. Alle Angaben in nM.

Bei konstantem K_i nähert sich die Kurvenform mit steigender Enzymkonzentration $[E]$ von einer hyperbolischen Form immer mehr einer Geraden an. Dabei liegen die Graphen immer dichter beieinander. Anders formuliert: Bei gleichem $\Delta[E]$ ändert sich der Verlauf des Graphen immer weniger. Das bedeutet im Umkehrschluss für den Assay, bei dem wir anhand der Messpunkte mit nicht linearer Regression den Graphen rekonstruieren, dass, bei im Vergleich zu K_i großer Enzymkonzentration (Titrationsbedingungen), schon kleine Änderungen der Messpunkte große Änderungen in der kalkulierten Enzymkonzentration $[E]$ hervorrufen.

In der Theorie des Rechenmodells sind Titrationsbedingungen zur Berechnung von $[E]$ also besonders günstig. Denn wie Abbildung 4.16 (Seite 63) zeigt, spielt K_i für die Enzymkinetik unter Titrationsbedingungen näherungsweise keine Rolle mehr und fällt aus der Formel, so dass die kalkulierte Enzymkonzentration nur noch von den Variablen v_i , v_0 und $[I]$ ⁹⁶ bestimmt wird. Im Assay hingegen ist verfahrensbedingt die Empfindlichkeit gegenüber Messfehlern aber gerade hier besonders hoch. Eine Möglichkeit der Berechnung der aktiven Enzymkonzentration außerhalb der Titration, wie sie im weiterentwickelten Rechenmodell realisiert wurde, ist also hilfreich.

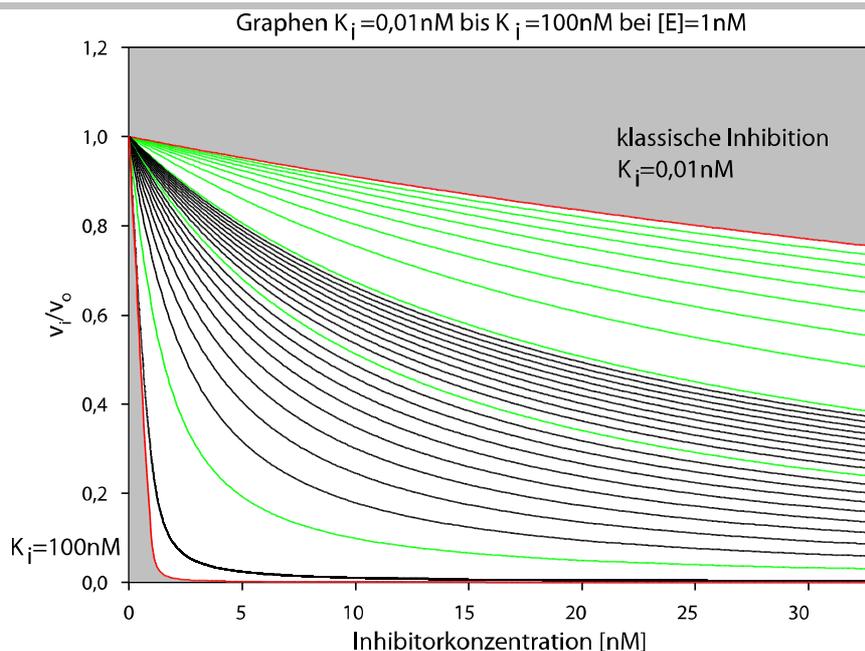
Am anderen Extrem der Gleichung (Formel 4.4) - unter den Bedingungen klassischer Inhibition - ist es umgekehrt: K_i hat hier einen erheblichen Einfluss auf den Graphen. Die Enzymkonzentration $[E]$ verschwindet im äußersten Fall näherungsweise aus der Gleichung (Formel 4.6). Die Graphen liegen hier relativ weit auseinander, so dass sich $[E]$ im Assay leichter aus den Messpunkten rekonstruieren lässt.

Dass K_i unter den Bedingungen der klassischen Inhibition den dominierenden Einfluss auf die Morphologie des Graphen ausübt (vgl. Kapitel 5.3.1.2), bedeutet auch, dass sich K_i hier gut aus der Morphologie rekonstruieren lässt, wie es im Assay praktiziert wird. Allerdings gilt hier - analog zu $[E]$ unter Titrationsbedingungen: Bereits kleine Veränderungen der Morphologie (Messfehler!) haben großen Einfluss auf die berechneten Werte.

5.3.1.2 K_i BEI KONSTANTER ENZYMKONZENTRATION $[E]$

K_i verhält sich in gewisser Weise spiegelbildlich zu $[E]$. Die Dichte der Graphen nimmt in der Nähe der klassischen Inhibition zu. Die Form des Graphen wird quasi ausschließlich von K_i bestimmt.

⁹⁶ v_i =Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Anwesenheit von Inhibitor v_0 =Substratumsatz ohne Inhibitor
 $[I]$ =Inhibitorkonzentration

Abbildung 5.6: Verhalten des Rechenmodells bei Änderungen in K_i und konstantem $[E]$ 

Analog zu Abbildung 5.5 ist hier eine mit der allgemeinen Formel für reversible, kompetitive, festbindende Inhibitoren (Formel 4.4) generierte Kurvenschar zu sehen, bei der die Inhibitionskonstante K_i zwischen 0,01 nM und 100 nM variiert, während die Enzymkonzentration $[E]$ bei einem Wert von 1 nM konstant bleibt. Die Schrittweite zwischen grünen Graphen beträgt 10 nM, zwischen schwarzen Graphen 1 nM. Die äußersten, rot gefärbten, Graphen markieren die Grenzen zu Titrationsbedingungen bzw. klassischer Inhibition nach der Definition von Abbildung 4.16. Sowohl Enzym- wie auch Inhibitorkonzentration sind in nM angegeben.

Unter Titrationsbedingungen verschwindet K_i aus dem Modell (Abbildung 4.16) und lässt sich folglich auch nicht bestimmen! Bei der nicht-linearen Regressionsanalyse mit der allgemeinen Formel 4.4 wird zwar ein Wert für K_i ausgegeben, muss aber als bedeutungslos betrachtet werden.

5.3.1.3 DAS VERHÄLTNISS DER ENZYMKONZENTRATION $[E]$ ZU K_i

Bisher wurden der Einfachheit halber $[E]$ und K_i getrennt betrachtet. In der Praxis stehen beide Größen jedoch als gleichberechtigte Variablen im Rechenmodell. Die Aussagekraft der bei der Regressionsanalyse berechneten Werte für K_i , respektive E , wird durch den Quotienten $\frac{E}{K_i}$ bestimmt. Er hängt mit anderen Worten also davon ab, ob entweder klassische Inhibition, ein *steady state* Gleichgewicht, oder Titrationsbedingungen vorliegen. Da K_i die entscheidende Größe zur Berechnung der Resistenzfaktoren ist, ist es tendenziell günstiger, unter den Bedingungen der klassischen Inhibition zu messen. Ganz allgemein sind für eine Messung *steady state*-Bedingungen wünschenswert, die eine Mitte zwischen den beiden Extremen der klassischen Inhibition und der Titration repräsentieren und somit durch die allgemeine Formel 4.4 gut beschrieben werden (Abbildung 4.16, Seite 63).

Im Assay stellt sich also die Frage, wie die Messbedingungen, **ohne Kenntnis der enzymkinetischen Eigenschaften der zu messenden Proteasen**, von vornherein so gewählt werden können, dass die Wahrscheinlichkeit einer, hinsichtlich K_i gut zu interpretierenden, hyperbolen Messkurve im Fluoreszenzassay hoch ist.

Die Antwort folgt unmittelbar aus den eben angestellten Überlegungen: Gute Messbedingungen liegen vor, wenn

- K_i gegenüber $[E]$ groß ist (Abbildungen 5.5 Seite 75 und 5.6 Seite 77),
- der Quotient $\frac{[E]}{K_i}$ also klein ist und damit
- näherungsweise klassische Inhibition vorliegt (Abbildung 4.16 Seite 63).

5.3.1.4 EINFLUSS DER SUBSTRATKONZENTRATION AUF $[E]/K_i$

Auch die Substratkonzentration hat – wie im Methodenteil beschrieben - Einfluss auf die Messbedingungen. Denn genau genommen wird im Assay nicht K_i selbst, sondern die von der Substratkonzentration abhängige apparente Inhibitionskonstante $K_{i(app)}$ im Äquilibrium, gemessen, die mit K_i über Formel 4.2 (Seite 60) zusammenhängt. Exakt muss also nicht $\frac{[E]}{K_i}$, sondern $\frac{[E]}{K_{i(app)}}$ betrachtet werden. Ersetzt man $K_{i(app)}$ durch Formel 4.2, erhält man:

Formel 5.1: Der Quotient $[E]/K_{i(app)}$

$$\frac{[E]}{K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)}$$

$[E]$	Enzymkonzentration
$[S]$	Substratkonzentration
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

Bei hohen Substratkonzentrationen nimmt der Nenner große Werte an, der Quotient wird klein, man nähert sich den Bedingungen der klassischen Inhibition (Abbildung 4.16). Das bedeutet, dass alleine durch Erhöhen der Substratkonzentration die Bedingungen der klassischen Inhibition erreicht werden können.

5.3.2 KONSEQUENZ FÜR DIE WAHL DER MESSBEDINGUNGEN

Zusammenfassend kann man also sagen, dass, unabhängig von den individuellen enzymkinetischen Eigenschaften der zu untersuchenden Protease, gute Messbedingungen hinsichtlich K_i vorliegen wenn

- Die in den Test eingesetzte Enzymkonzentration im Verhältnis zu K_i klein ist, bzw.
- K_i im Verhältnis zur Enzymkonzentration groß ist
- die Substratkonzentration im Verhältnis zu K_m groß ist.

Die Enzymkonzentration und die Substratkonzentration können – in gewissen Grenzen – frei gewählt werden. Es sollte daher versucht werden,

- möglichst wenig Protease einzusetzen und
- in Anwesenheit eines möglichst großen Substratüberschusses zu messen.

Die K_m des künstlichen Fluoreszenzsubstrates liegt bei $103 \mu\text{M}$ ($\pm 8 \mu\text{M}$ SD; 30°C) (Matayoshi et al. 1990), die aktuell verwendete Substratkonzentration im Assay bei $10 \mu\text{M}$, so dass bei der Regulierung dieses Parameters theoretisch viel Raum bleibt. Limitierend ist dabei in Bezug auf die Protease, dass ein Mindestmaß an Aktivität zur Messung benötigt wird - in Bezug auf das Substrat, hohe Kosten und störende Hintergrundfluoreszenz.

5.4 BESTIMMUNG DER QUALITÄT DES ASSAYS

Bei der Beurteilung der Qualität einer Messung muss zwischen Kriterien zur Beurteilung der Messung selbst und Kriterien zur Güte der Regressionsanalyse unterschieden werden.

5.4.1 QUALITÄT DER MESSUNG

5.4.1.1 MESSBEDINGUNGEN

Die Validität der Daten des Fluoreszenzassays ist abhängig von den enzymkinetischen Bedingungen, unter denen gemessen wurde. Wie oben ausgeführt, eignen sich nur *steady state*-Bedingungen und klassische Inhibition zu Bestimmung von K_i . Eine bei Titrationsbedingungen bestimmte K_i ist bedeutungslos.

Ein einfaches Maß für die Qualität der Messbedingungen ist der Quotient $\frac{[E]}{K_i}$. Ein berechtigter Kritikpunkt hierbei ist, dass der Test gewissermaßen mit sich selbst überprüft wird. Inhibitionskonstante sowie Enzymkonzentration und damit auch $\frac{[E]}{K_i}$ wurden ja erst im Assay errechnet.

Ein alternatives Verfahren wäre ein so genannter F-Test. Mithilfe eines F-Testes ist es möglich zu beurteilen, welche der Gleichungen den gemessenen Datensatz am besten erklären kann. Es ist naheliegend, aus dem Ergebnis des F-Testes zu folgern, dass die durch die passendste Gleichung beschriebenen enzymkinetischen Bedingungen vorgelegen haben.

Dieses aufwändige Verfahren ist in der Praxis jedoch nicht notwendig. Die Kontrolle über $\frac{[E]}{K_i}$ ist für die Bedürfnisse des diagnostischen Assays vollkommen ausreichend. Tabelle 5.3 zeigt exemplarisch die Quotienten $\frac{[E]}{K_i}$ für die Patientenproteasen 73, 86 und 174 sowie 2 Wildtypen.

Tabelle 5.3: Der Quotient $[E]/K_i$ als Kontrolle der Messbedingungen

Inhibitor	Protease 73	Protease 86	Protease 174	WT899	WTLeuven
APV	3,1	2,3	1,4	5,5	0,7
IDV	1,1	0,6	0,3	2,1	0,4
LPV	118,0	416,1	26,1	164,0	6,6
NFV	1,4	0,4	0,3	2,4	0,2
RTV	13,9	11,0	2,9	30,3	1,1
SQV	3,2	1,7	1,9	7,1	0,8

Aus den Werten geht klar hervor, dass für den verhältnismäßig neuen Inhibitor Lopinavir bei der ersten Versuchsreihe (73, 86, 174, WT899) ungünstige Messbedingungen bestanden. Wie aus den Graphen der entsprechenden Messungen ersichtlich ist (Abbildungen 5.28, 5.30 und 5.32 ab Seite 107), haben sich die Kurven stark Geraden angenähert. Solche Messungen müssen in der Routinediagnostik für die Berechnung von K_i ausgemustert werden. Hingegen eignen sie sich perfekt als Titrationsmessung zur Bestimmung der Enzymkonzentration.

Nach Anpassen der Inhibitorkonzentrationen für Lopinavir wurden in der zweiten Messreihe (WT-Leuven) deutlich günstigere Bedingungen erzielt.

Die von Bieth vorgeschlagenen Grenzen der durch die allgemeine Gleichung 4.4 beschriebenen *steady state*-Bedingungen liegen bei $\frac{[E]}{K_i} \leq 0,01$ für die klassische Inhibition und bei $\frac{[E]}{K_i} \geq 100$ für Titrationsbedingungen (Bieth 1995; Abbildung 4.16, Seite 63). Die Grenze zur klassischen Inhibition spielt wie Tabelle 5.3 zeigt im Test keine Rolle, da sie quasi nie erreicht wird. Die Grenze zur Titration wird jedoch relativ häufig überschritten. Trotzdem ist der von Bieth genannte Schwellenwert zur Titration $\frac{[E]}{K_i} \geq 100$ für die Bedürfnisse des Assays eher noch zu hoch angesetzt. Im Sinne valider Testergebnisse ist vorzuschlagen, bereits Messungen mit $\frac{[E]}{K_i} \geq 50$ zu verwerfen.

5.4.1.2 ANALYSE DER MESSGRÖSSEN DES ASSAYS

Abgesehen von den Messbedingungen, unter denen sie generiert wurden, müssen auch die Messdaten selbst einer kritischen Analyse unterzogen werden. Im Folgenden werden daher alle Größen der zur Regression verwendeten Gleichung 4.4 auf Ihre Variabilität untersucht. Messtechnische Schwierigkeiten werden aufgespürt und mögliche Lösungsansätze zu deren Überwindung diskutiert.

5.4.1.2.1 DIE INHIBITORKONZENTRATION [I]

Die Gesamtkonzentration des freien und komplexierten Inhibitors ist durch das ins well zugegebene Volumen einer Inhibitor-Stocklösung vorgegeben. Mögliche Fehler reduzieren sich somit auf Pipetierfehler. Trotzdem handelt es sich um eine problematische Fehlerquelle, denn

- die im Rahmen des Assays verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind sehr klein, liegen im Bereich weniger Nanomole. Zu ihrer Herstellung sind umfangreiche und damit fehlerträchtige Verdünnungsreihen notwendig. Schon kleinste Änderungen der Inhibitorkonzentration haben starke Effekte auf die Messpunkte.
- das mathematische Modell zur Berechnung der Inhibitionskonstanten K_i stellt hohe Anforderungen an die Präzision der Inhibitorkonzentrationen. Die Inhibitorkonzentrationen bilden in den folgenden Berechnungen die Abszisse. Ihre absolute Richtigkeit ist eines der Axiome für die nicht lineare Regressionsanalyse nach dem Marquardt-Leuvenberg-Algorithmus (Marquardt 1963), der davon ausgeht, dass alleine die Ordinate variabel ist.

Mathematische Verfahren nicht-linearer-Regression, die eine Variabilität in beiden Achsen berücksichtigen, sind derzeit in kein handelsübliches Statistikprogramm integriert.

Das bisherige Protokoll, jedes well einzeln zu pipettieren, scheint in diesem Zusammenhang hinsichtlich einer maximal möglichen Präzision sowie der Vermeidung systematischer Fehler suboptimal. Im Rahmen dieser Arbeit kamen deshalb automatische Pipetten bzw. Multipipetten zum Einsatz. Die Anzahl der zur Herstellung der Mikrotiterplatten notwendigen Pipettierschritte wurde minimiert, die zu pipettierenden Volumina maximiert. Die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Mikrotiterplatten konnte durch Verwendung von *deep well plates* (Abbildung 5.7) als gemeinsamen Stock verbessert werden. Diese großlumigen Mikrotiterplatten können als Stocklösungen tiefgefroren und ca. 3 Monate ohne signifikante Einbussen bei der Messung wiederverwendet werden. Positiver Nebeneffekt war eine erhebliche Beschleunigung des Messplatten-Herstellungsprozesses.

Abbildung 5.7: deep well plate



Eine darüber hinaus gehende Präzision der InhibitorKonzentration ließe sich eventuell beim Einsatz von Pipettierautomaten erreichen.

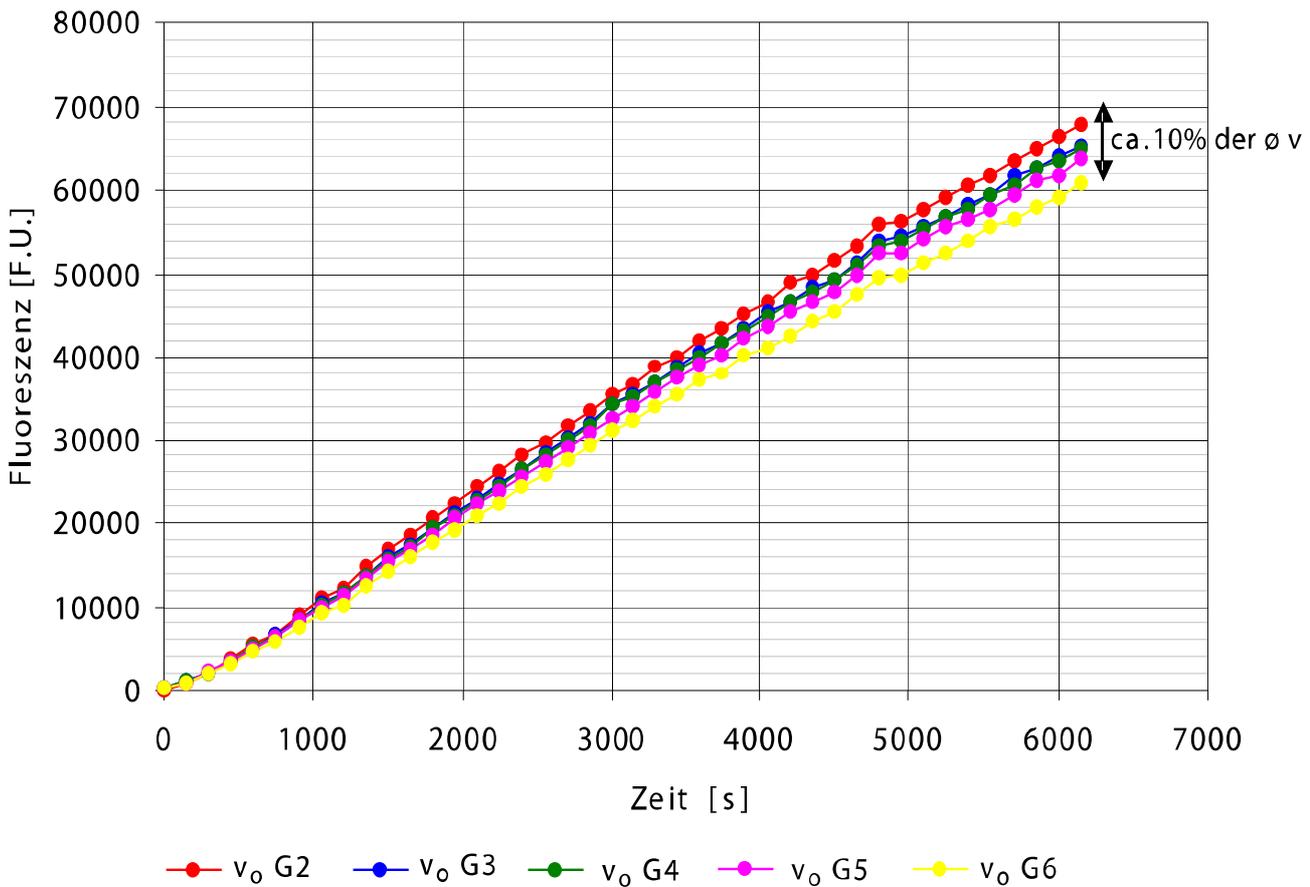
5.4.1.2.2 DER SUBSTRATUMSATZ v

Der Substratumsatz je Zeiteinheit ist die zentrale Größe des Testsystems und wird nativ, das heißt in Abwesenheit von Inhibitoren und in Gegenwart aufsteigender InhibitorKonzentrationen bestimmt.

5.4.1.2.2.1 DER SUBSTRATUMSATZ IN ABWESENHEIT VON INHIBITOR (v_0)

Der Substratumsatz in Abwesenheit von Inhibitor ist eine Referenzgröße, die über den in die Berechnung der Resistenzfaktoren eingehenden Quotienten $\frac{v_i}{v_0}$ (Formel 4.4 Seite 62) jeden Messwert beeinflusst. Eine möglichst exakte Bestimmung ist daher besonders wichtig. Dem wurde im Plattenlayout durch Mehrfachbestimmung Rechnung getragen.

Abbildung 5.8: Mehrfachbestimmung des Substratumsatzes ohne Inhibitor



	G2	G3	G4	G5	G6
V [FU/min]	684	662	658	653	613

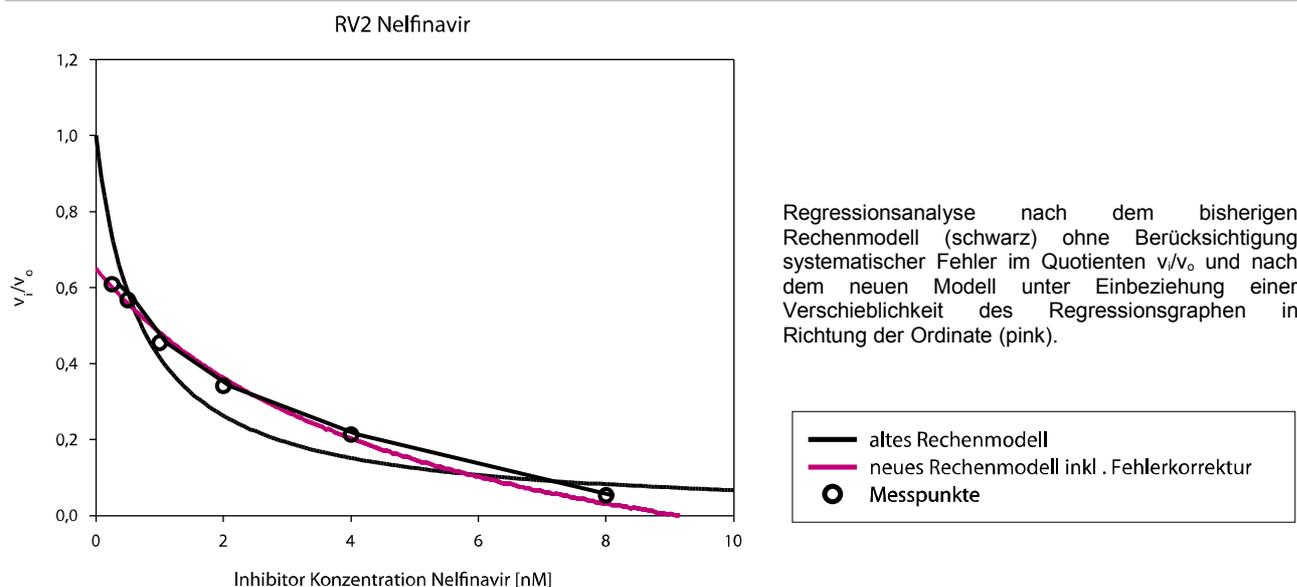
Der Substratumsatz einer Protease in Abwesenheit von Inhibitoren v_0 ist eine zentrale Bezugsgröße des Assays und beeinflusst über den Quotienten v_i/v_0 alle anderen Messwerte der Mikrotiterplatte. Er wird deshalb in parallelen Ansätzen mehrfach bestimmt.

In diesem Beispiel (Protease 86) schwankt der gemessene Substratumsatz zwischen den Wells G2 bis G6 um ca. 10 %. Jeder Fehler in v_0 verursacht eine systematische Verschiebung des Quotienten v_i/v_0 . Diese Verschiebung verfälscht die nichtlineare Regressionsanalyse (Abbildung 5.25 Seite 100).

Die Schwankungsbreite von v_0 beträgt zwischen 3 und 10 % der Durchschnittsgeschwindigkeit. Der absolute Stoffumsatz der ungehemmten Wildtyp-Proteasen schwankt damit, bei den hier untersuchten 5 Messungen, zwischen 613 F.U./min und 684 F.U./min. Diese Schwankung kann auch als Schätzwert für die Schwankung von v_i herangezogen werden.

Durch Fehler in v_i und v_0 entstehen Verschiebungen der Messpunkte. Im Unterschied zu v_i verursachen Schwankungen in v_0 systematische Fehler. Da jeweils Quotienten gebildet werden, ist die Beeinflussung der Messpunkte nicht einheitlich. V_i -Werte bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen werden stärker verschoben, als solche bei hohen (Abbildung 5.26 Seite 100).

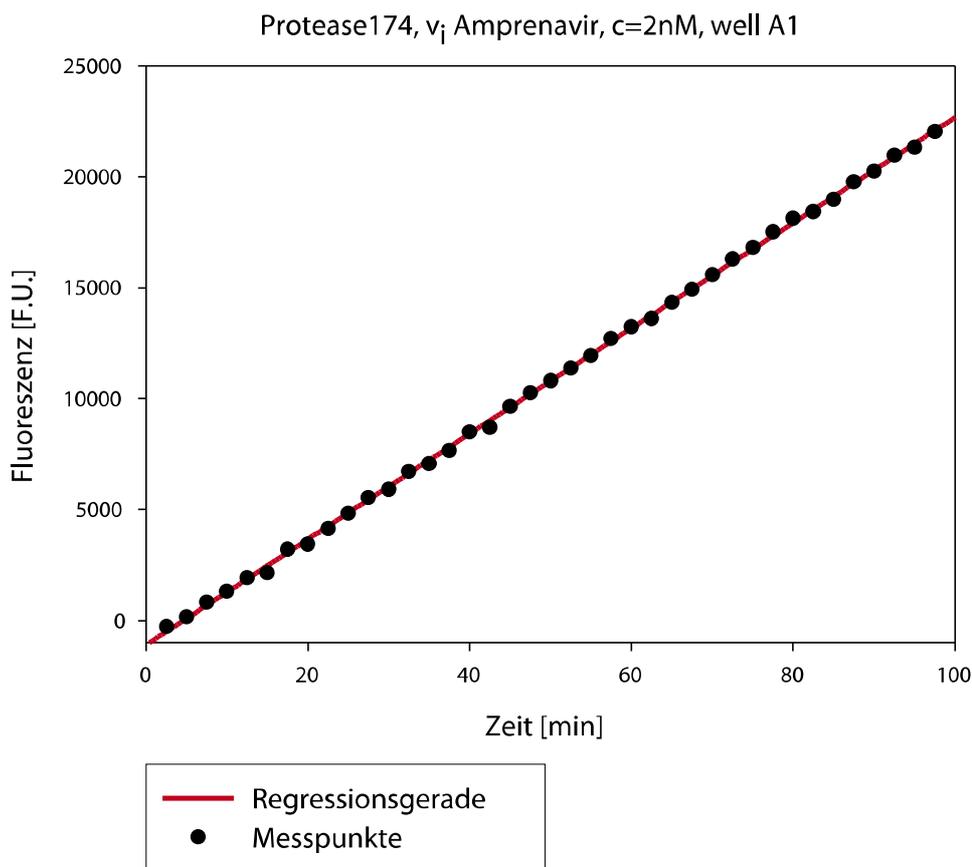
Solche Fehler können fatale Auswirkungen auf die in der Regressionsanalyse prognostizierten Graphen haben: Obwohl die Messpunkte augenscheinlich einen mit dem Modell gut übereinstimmenden Graphen beschreiben, werden unplausible Kurven errechnet.

Abbildung 5.9: Korrektur systematischer Fehler in v_i/v_0 

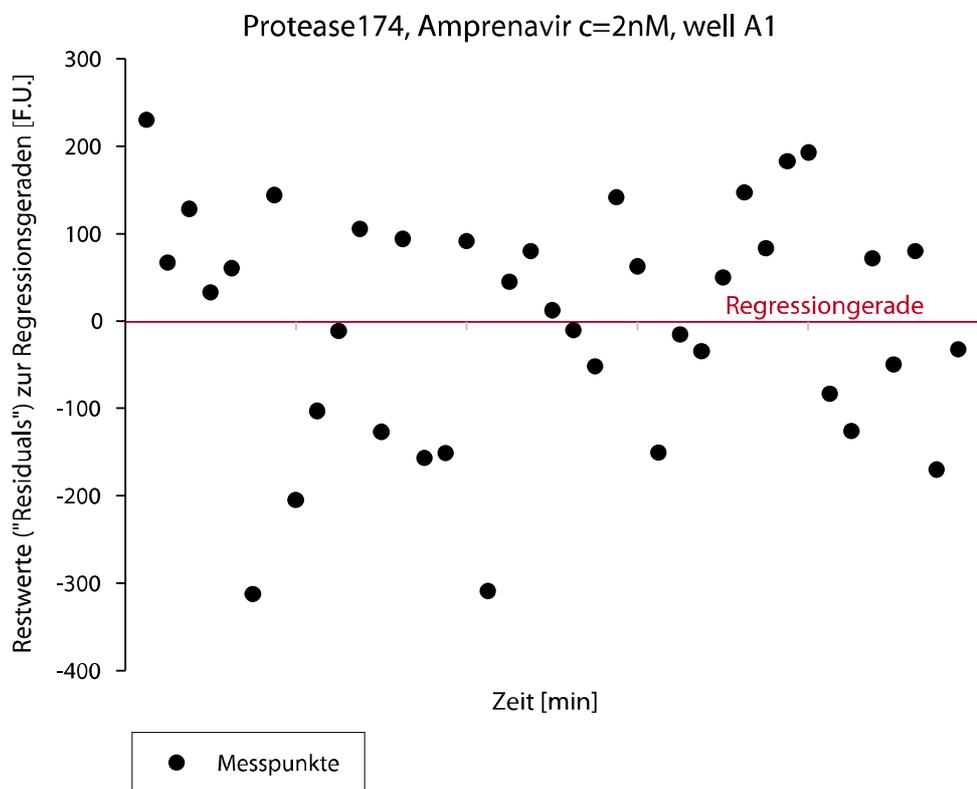
Der systematische Anteil solcher Fehler kann wie in Abbildung 5.9 demonstriert – wenigstens teilweise – durch die Anpassung des Rechenmodells kompensiert werden (siehe auch Kapitel 5.5 Seite 95).

5.4.1.2.2.2 DER SUBSTRATUMSATZ IN GEGENWART VON INHIBITOR (v_i)

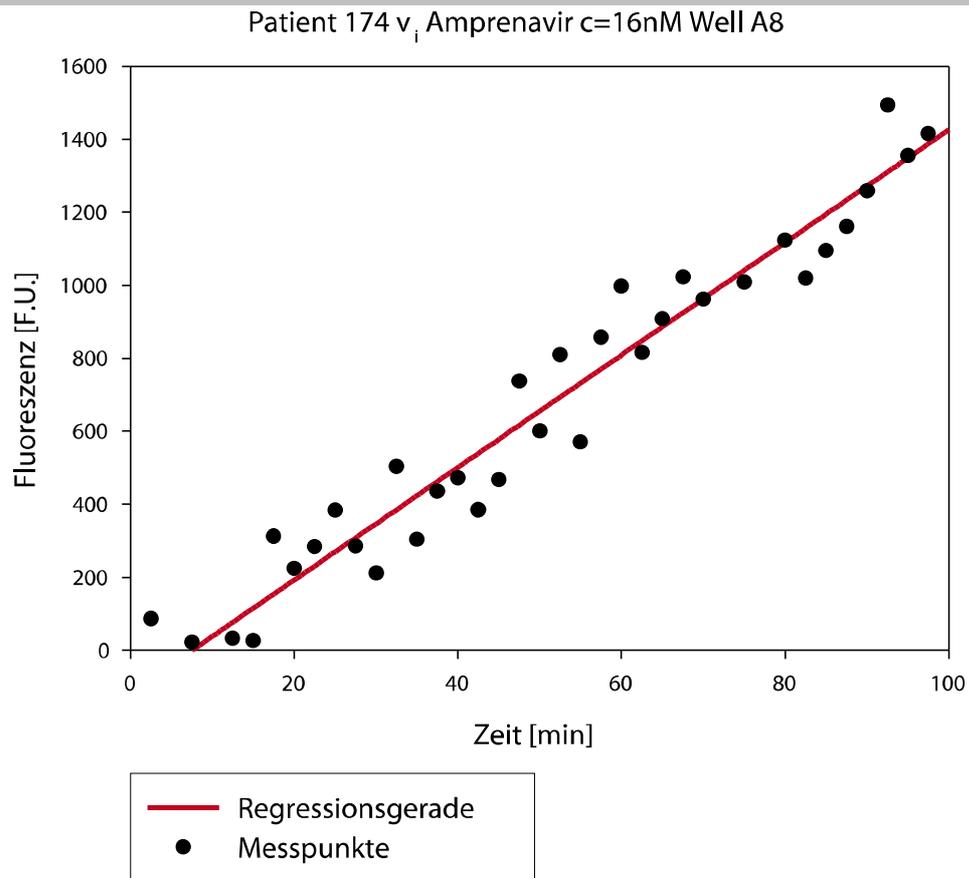
Zur Untersuchung der Streuung des Substratumsatzes in Gegenwart von Inhibitor (v_i) wurden die Residuen, die Differenzen der tatsächlich gemessenen Punkte zu den durch die Regressionsgrade prognostizierten Punkten, ihre Standardabweichungen und die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden analysiert. Beispielhaft wird hier das erste und letzte well der Messreihe für Amprenavir bei Protease 174 gezeigt:

Abbildung 5.10: Beispielgraph v_i , erstes Well der Messreihe

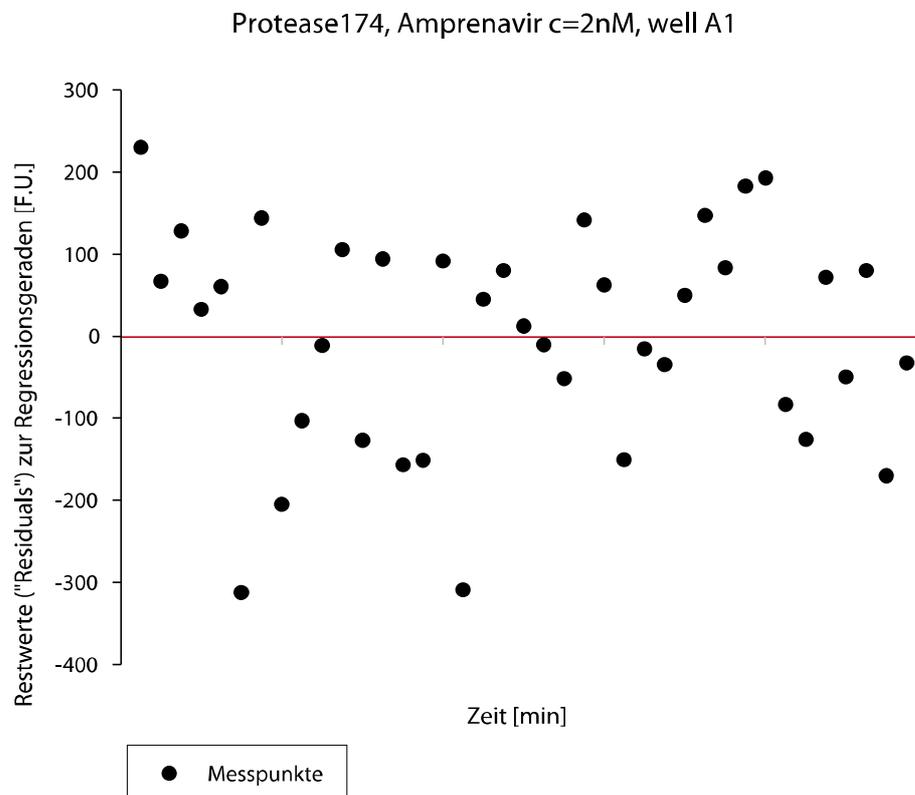
a) Messung der Fluoreszenzzunahme und Bestimmung von v_i durch die Steigung der Regressionsgeraden, Protease 174 Amprenavir $c=2\text{ nM}$, Well A1



b) Abstand der Messpunkte zur Regressionsgeraden (engl. *residuals*), Well A1.

Abbildung 5.11: Beispielgraph v_i , letztes Well der Messreihe

a) Messung der Fluoreszenzzunahme und Bestimmung von v_i durch die Steigung der Regressionsgeraden, Protease 174 Amprenavir $c=16\text{ nM}$, Well A8



b) Abstand der Messpunkte zur Regressionsgeraden (engl. *residuals*), Well A8

Tabelle 5.4: Die Geschwindigkeit des Stoffumsatzes in einer Messreihe

Well	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
V_i (F.U./min)	238	132	72	44	31	24	22	15
St.Dev.Residuen (F.U./min)	132	144	141	140	98	151	148	101
St.Dev.Residuen/ v_i	0,56	1,08	1,96	3,16	3,17	6,24	6,82	6,55

Wie man Tabelle 5.4 und den Streudiagrammen (engl. *scatterplots*) der Residuen entnehmen kann, schwankt die Streubreite der gemessenen Fluoreszenzwerte in den Wells einer Messreihe, unabhängig von Inhibitorkonzentration und gemessenem Stoffumsatz, nur geringfügig. In unserem Beispiel variiert die Standardabweichung der Residuen zwischen einem Minimum von 98 F.U. in Well A5 und einem Maximum von 151 F.U. in Well A6. Damit liegt die relative Standardabweichung stets unter 1 % des jeweiligen Messbereiches.

Die scheinbar größere Streuung der Messpunkte der Geschwindigkeitsmessung in well A8 gegenüber well A1 erklärt sich wesentlich aus den unterschiedlichen Skalen.

Schon anhand der Graphen ist jedoch offensichtlich, dass die Berechnung der Regressionsgeraden in well A1 eindeutiger gelingt als in well A8. Ursache ist der absolute Betrag des in well A1 in Anwesenheit von „nur“ 2 nM Inhibitor gemessenen Stoffumsatzes, der mit 238 F.U./min etwa um den Faktor 15 höher liegt, als der in well 8 bei einer c von 16 nM gemessene Stoffumsatz von 15 F.U./min. Der Messfehler ist in beiden Wells jedoch nahezu gleich.

Der – seinem absoluten Betrag nach – in etwa konstante Messfehler wird bei kleinen Umsatzgeschwindigkeiten v_i relativ immer größer. Daraus folgt, dass der Assay große Stoffumsätze deutlich genauer bestimmen kann, als kleine.

Mathematisch kann die Qualität einer Regressionsgeraden u. a. durch den Korrelationskoeffizienten⁹⁷ beschrieben werden, ein Maß dafür, wie genau das Regressionsmodell (hier die Gerade) die Daten beschreibt. Quadriert man den Korrelationskoeffizienten, erhält man das so genannte Bestimmtheitsmaß, das ebenfalls eine anschauliche Bedeutung hat: Es gibt an, welcher Anteil der Varianz einer Größe durch die Korrelation mit einer anderen Größe erklärt wird.

Tabelle 5.5 zeigt, wie sich Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmass mit steigender Inhibitorkonzentration bzw. abnehmendem v_i und Stoffumsatz entwickeln.

Tabelle 5.5: Entwicklung von R und R² in einer Messreihe

	Well A1	Well A2	Well A3	Well A4	Well A5	Well A6	Well A7	Well A 8
R	0,9990	0,9980	0,9960	0,9890	0,9750	0,9670	0,9590	0,9670
R ²	0,9980	0,9960	0,9920	0,9780	0,9506	0,9350	0,9197	0,9350
V_i (F.U./min)	238	132	72	44	31	24	21	15

⁹⁷ genau: Produktmoment-Korrelationseffizient nach Pearson

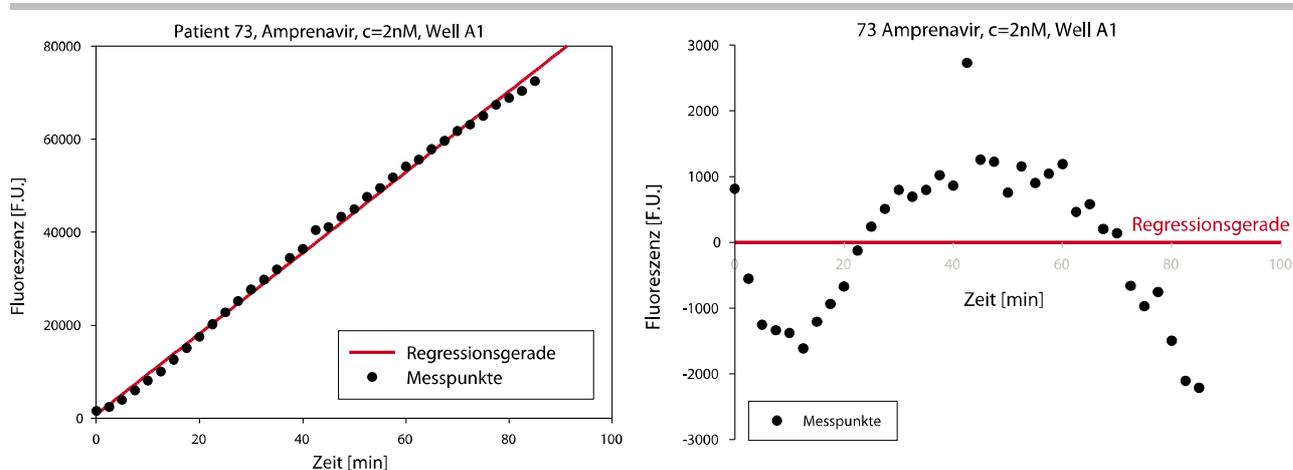
R und R^2 nehmen mit sinkendem Stoffumsatz leicht ab. Die Messpunkte werden also nicht mit der gleichen Genauigkeit bestimmt. Das verletzt genau genommen ein Grundaxiom der, zur Bestimmung der Resistenzfaktoren angewandten, nicht linearen Regressionsanalyse nach dem Maquardt-Leuvenberg-Algorithmus, die einen für alle Punkte gleichen Fehler voraussetzt. Da es sich jedoch um sehr geringfügige Schwankungen handelt, kann dieser Fehler bei der Berechnung der Resistenzfaktoren vernachlässigt werden.

Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes gehört dank zahlreicher Messpunkte und hoher Sensitivität des Lesegerätes sicher zu den insgesamt verlässlichsten Größen des Assays. Verfälscht wird sie insbesondere durch systematische Fehler.

5.4.1.2.2.3 SYSTEMATISCHE FEHLER IM SUBSTRATUMSATZ V

Streudiagramme der Residuen helfen bei der Aufdeckung systematischer Messfehler. In obigem Beispiel (Abbildung 5.10 Seite 84 und Abbildung 5.11 Seite 85) ist die Verteilung der Punkte ober- und unterhalb der Regressionsgerade sowie die Streubreite in etwa gleich. Es darf daher mit guter Näherung angenommen werden, dass die Messwerte normal verteilt um die Regressionsgerade liegen. Die Streuung ist somit durch den unvermeidlichen, „natürlichen“ Messfehler bedingt. In einigen Fällen wurden jedoch Verteilungen beobachtet, die mit einer Normalverteilung nicht vereinbar sind.

Abbildung 5.12: Systematische Fehler in v_i

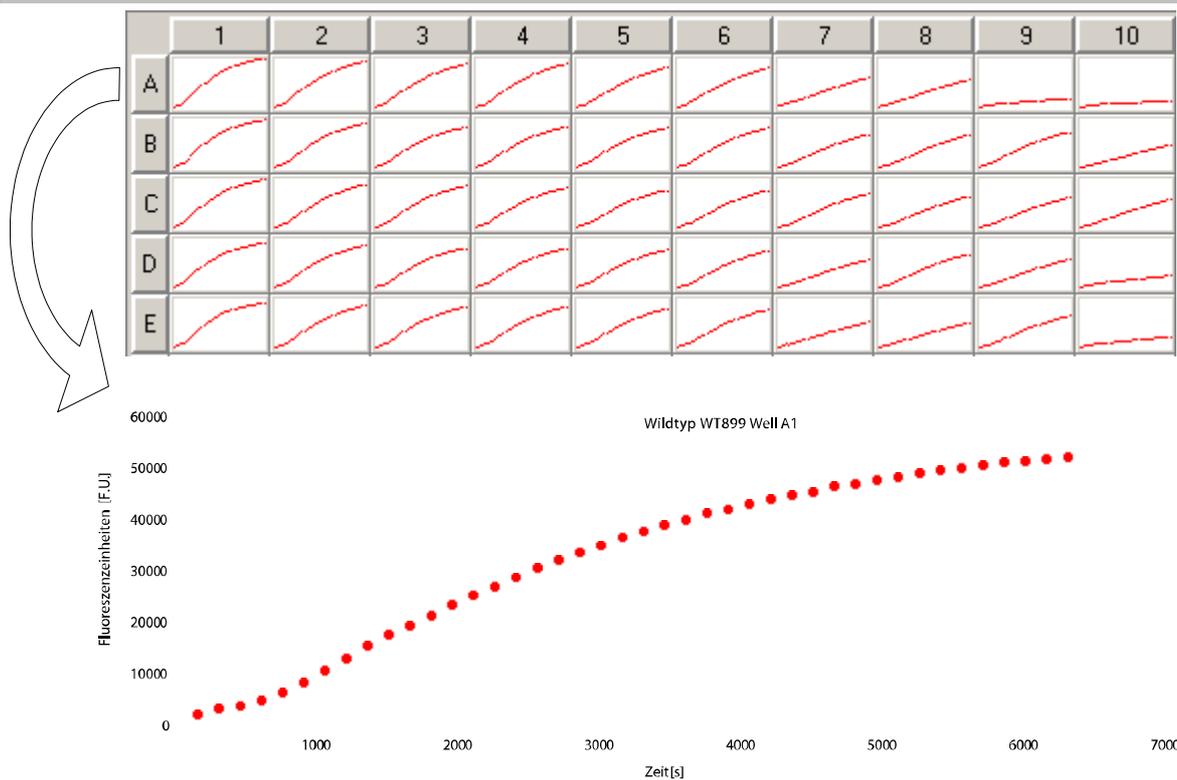


links: Bei oberflächlicher Betrachtung scheinen die Messwerte nur geringfügig um die Regressionsgerade zu streuen.

rechts: Die Analyse der Residuen deckt einen systematischen Messfehler auf.

Während die Regressionsgerade zunächst noch recht unverdächtig aussieht (Abbildung 5.12), verrät ein Blick auf das Streudiagramm der Residuen (Abbildung 5.12) sofort einen systematischen Messfehler. Die sinus- bzw. glockenförmige Streuung der Messpunkte fand sich in unterschiedlich starker Ausprägung auf zahlreichen Messplatten. Ein systematischer Fehler liegt nahe. Hielte es sich um einen, durch statistische Streuung bedingten, natürlichen Messfehler, wäre eine symmetrische Punktwolke wie in Abbildung 5.11 (Seite 85) zu erwarten.

Abbildung 5.13: Beispiel eines stark ausgeprägten systematischen Messfehlers



Modifizierte Bildschirmdarstellungen der Steuersoftware KC4 bei einer Messung des Wildtyps WT899. Oben: Übersicht Mikrotiterplatte. Unten: höher aufgelöste Darstellung des Wells A1. Bereits mit bloßem Auge ist ein systematischer Fehler bei der Bestimmung der Enzymaktivität zu erkennen. Anstelle der zu erwartenden Geraden wurden Kurven gemessen.

Diese Schwankungen treten in allen Wells unabhängig voneinander etwa gleichzeitig auf (Abbildung 5.13). Lässt man die ersten Messpunkte im Sinne eines Artefakts außer acht, muss die Kurve als An- und anschließendes Abschwächen der Aktivität interpretiert werden. Als möglicher Auslöser sind Temperaturschwankungen denkbar. Ein anderes Erklärungsmodell ist, dass die schwer lösliche Protease sich erst mit der Zeit gleichmäßig im well verteilt und damit an Aktivität gewinnt. Das leichte Abklingen könnte auf die Instabilität des rekombinant hergestellten Enzyms zurückzuführen sein.

5.4.1.2.3 DIE ENZYMKONZENTRATION [E]

Das weitaus schwierigste Problem stellt die Messung der Enzymkonzentration dar. Prinzipiell wurden bisher 3 Verfahren zur Bestimmung eingesetzt: die

- Messung von [E] mit einem Immunoblot
- Bestimmung von [E] durch Titration.
- Schätzung von [E] als 2. Variable in der nichtlinearen Regressionsanalyse.

5.4.1.2.3.1 BESTIMMUNG VON [E] VIA IMMUNOBLLOT

Die Herstellung von Antikörpern gegen Epitope der HIV-Protease für eine Färbung (engl. *staining*) im Immunoblot gestaltet sich wegen der geringen Molekülgröße der Protease von nur 99 Amino-

säuren ausgesprochen schwierig. Dennoch wurde in unserer Arbeitsgruppe ein zuverlässiger polyclonaler Antikörper aus Kaninchenserum extrahiert.

Wie vorausgehende Arbeiten zeigten, kann damit zwar zuverlässig die Protease-Gesamtkonzentration bestimmt werden (Gehring 2001; Hoffmann 2002). Letztere steht jedoch in keiner klaren Beziehung zum Anteil des aktiven Enzyms. Ein Immunoblot weist also HIV-Protease zuverlässig nach, erlaubt aber keine Aussagen über den Anteil des aktiven Enzyms.

5.4.1.2.3.2 BESTIMMUNG VON [E] VIA TITRATION

Bei der so genannten Titration wird eine enzymkinetische Messung unter den für die Bestimmung der Enzymkonzentration optimalen Titrationsbedingungen durchgeführt (Abbildung 4.16, Seite 63). Durch eine Regressionsanalyse mit Formel 4.5 kann die Enzymkonzentration berechnet werden. Problematisch ist hierbei das Erreichen der Titrationsbedingungen, die durch das Verhältnis $\frac{E_0}{K_i} \geq 100$ definiert sind. Die dazu notwendigen Enzymkonzentrationen sind hoch ($\frac{E_0}{K_i} \geq 100$!).

Dies ist ein kritisches Faktum, weil die für Messungen zu Verfügung stehende Menge aktiven Enzyms in der Praxis sehr begrenzt, nicht vorhersagbar und kaum steuerbar ist⁹⁸. Erfahrungsgemäß reicht die Menge aktiven Enzyms nur knapp zur Messung der Enzymaktivität in Anwesenheit der Inhibitoren. Eine Messung unter Titrationsbedingungen zur Bestimmung von [E], die zusätzliche große Enzymmengen verschlingt, ist daher nicht in jedem Fall möglich.

5.4.1.2.3.3 ENZYMKONZENTRATION [E] ALS 2. VARIABLE

Wegen der Schwierigkeiten der experimentellen Bestimmung wurde [E] bisher zumeist rechnerisch bestimmt. Dabei wird [E] als zweite Variable neben K_i durch nicht lineare Regressionsanalyse mit Formel 4.4 kalkuliert.

Eine pragmatische, aber keineswegs unproblematische Lösung denn,

1. die Enzymkonzentration wird unter den für seine Berechnung suboptimalen *steady state* Gleichgewichtsbedingungen bestimmt.
2. für verschiedene Inhibitoren errechnen sich teilweise drastisch unterschiedliche Enzymkonzentrationen, obwohl die Enzymkonzentration in allen Wells einer Messplatte tatsächlich immer konstant ist (es wird jeweils die gleiche Enzymmenge hinzu pipettiert!).

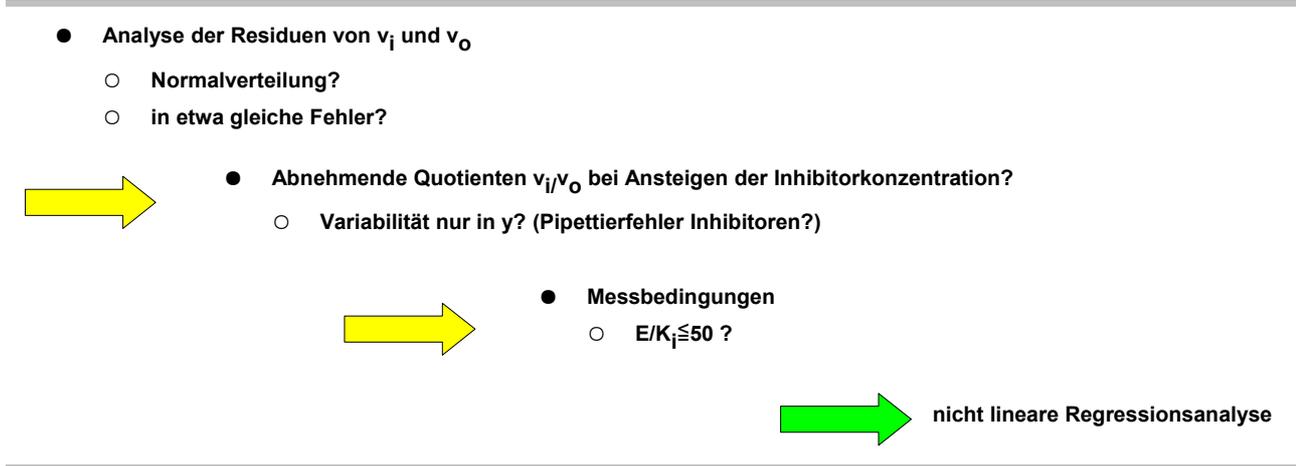
Während die einzige Lösung für Punkt 1 eine – enzymintensive – Verlagerung des Milieus zu Titrationsbedingungen ist, gibt es für Punkt 2 eine Lösung im Rahmen der Weiterentwicklung des Rechenmodells (siehe Kapitel 5.5 Seite 95).

⁹⁸Bei Expression und Aufarbeitung der HIV Protease wird zwar versucht die Ausbeute aktiven Enzyms durch parallele Ansätze zu maximieren, die gewonnenen Mengen variieren jedoch erheblich. Die Ursachen hierfür sind im Detail nicht bekannt. Sicher ist eine von Mutationen abhängige unterschiedliche Zytotoxizität. Tendenziell scheint eine Multiresistenz mit einer erhöhten Toxizität einherzugehen, so dass sich hochresistente Proteasen schwieriger herstellen lassen.

5.4.1.3 ALGORITHMUS DER MESSDATENAUFBEREITUNG FÜR DIE REGRESSIONSANALYSE

Bevor die Messdaten in die Regressionsanalyse einfließen, müssen sie zunächst einer Plausibilitätsprüfung unterzogen werden. Damit soll insbesondere überprüft werden, ob ein Datensatz die für eine nicht lineare Regressionsanalyse notwendigen Axiome erfüllt. Hierfür wurden die folgenden Kriterien begutachtet:

Abbildung 5.14: Prüfung der Plausibilität der Messdaten



5.4.2 QUALITÄT DER REGRESSIONSANALYSE

Die Qualität der Regressionsanalyse lässt sich anhand statistischer Kenngrößen einschätzen, die zusammen mit den Ergebnissen von der Software (hier *SigmaPlot 8.0*) ausgegeben werden. Der Regressionskoeffizient R und R^2 nähern sich umso mehr der 1, je besser ein Modell die vorliegenden Daten beschreibt. Der Standardirrtum ist ein Maß der Variabilität der kalkulierten Ergebnisse. t-Wert und P-Wert sind – im Unterschied zu den von der linearen Regression her bekannten Maßen – Schätzungen auf Basis der letzten Schritte der Regression vor dem Erreichen des Ergebnisses. Trotzdem sollte das übliche Niveau von maximal 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit gewahrt werden.

Abbildung 5.15: Ausschnitt Ergebnisprotokoll SigmaPlot

R = 0,99459185 Rsqr = 0,98921295 Adj Rsqr = 0,98732521
 Standardirrtum der Schätzung = 0,0253

	Regressionskoeffizient	Standardirrtum	t	P
E	2,0807	0,1054	19,7398	<0,0001
KA	0,8932	0,1005	8,8832	<0,0001
KI	3,7459	0,2609	14,3551	<0,0001
KL	0,0050	0,0097	0,5177	0,6075
KN	4,7392	0,3115	15,2154	<0,0001
KR	0,1899	0,0440	4,3175	0,0001

5.4.2.1 EINFLUSS EINZELNER MESSPUNKTE

Es ist möglich nicht nur die Qualität der gesamten Regression, sondern auch den Einfluss einzelner Messpunkte zu untersuchen. Ein hierfür geeignetes mathematisches Maß ist die so genannte Cooksche Distanz (engl. *Cook's Distance*). Sie gibt für jeden Punkt an, wie stark die Werte des Regressionskoeffizienten – in diesem Fall also K_i – sich ändern würden, wenn ein Messpunkt nicht in die Berechnung mit einbezogen wird.

Abbildung 5.16: Die Cooksche Distanz: Beispielgraphen

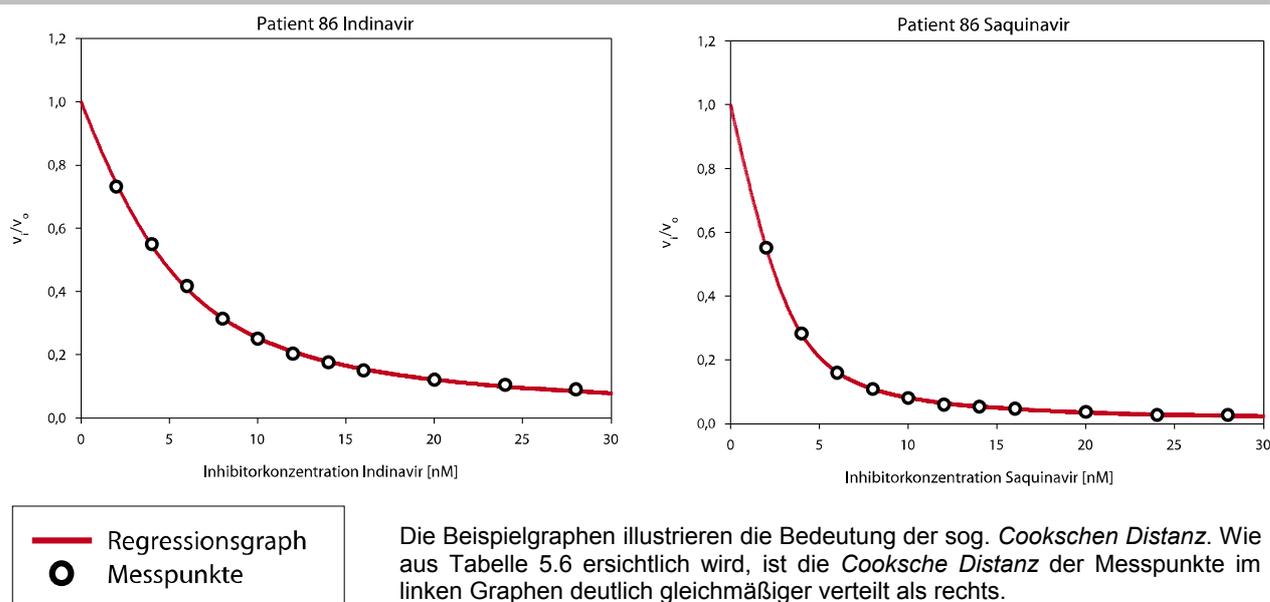


Tabelle 5.6: Cooksche Distanzen, Auszug aus dem Messprotokoll

Row	Cook's Dist	Leverage	DFFITS	Row	Cook's Dist	Leverage	DFFITS
2	0,9633	0,3331	-1,7311	2	3,3487	0,7423	-2,8333
3	0,3699	0,3826	0,8707	3	0,7874	0,3517	1,4375
4	0,4367	0,2276	1,0759	4	0,0453	0,2409	-0,2883
5	0,0150	0,1575	-0,1648	5	0,0006	0,1880	0,0314
6	0,0217	0,1490	-0,1994	6	0,0024	0,1396	-0,0649
7	0,1044	0,1516	-0,4618	7	0,2520	0,1043	-0,9290
8	0,0071	0,1497	-0,1127	8	0,0002	0,0797	0,0200
9	0,0374	0,1427	-0,2645	9	0,0055	0,0625	0,1002
10	0,0000	0,1219	0,0009	10	0,0060	0,0410	0,1046
11	0,0490	0,1009	0,3106	11	0,0040	0,0288	-0,0852
12	0,0409	0,0833	0,2843	12	0,0189	0,0212	0,2043

Wie Abbildung 5.16 zeigt, ist der Einfluss der Messpunkte im linken Graphen gleichmäßig verteilt. Im Rechten Graphen hat der erste Messpunkt ein überproportional großes Gewicht bei der Regression. Als Faustregel gilt: Eine Cooksche Distanz über 1 zeigt einen möglichen Einfluss an, über 4 ist von einem großen Effekt auf die Schätzung auszugehen. Messpunkte mit einer hohen

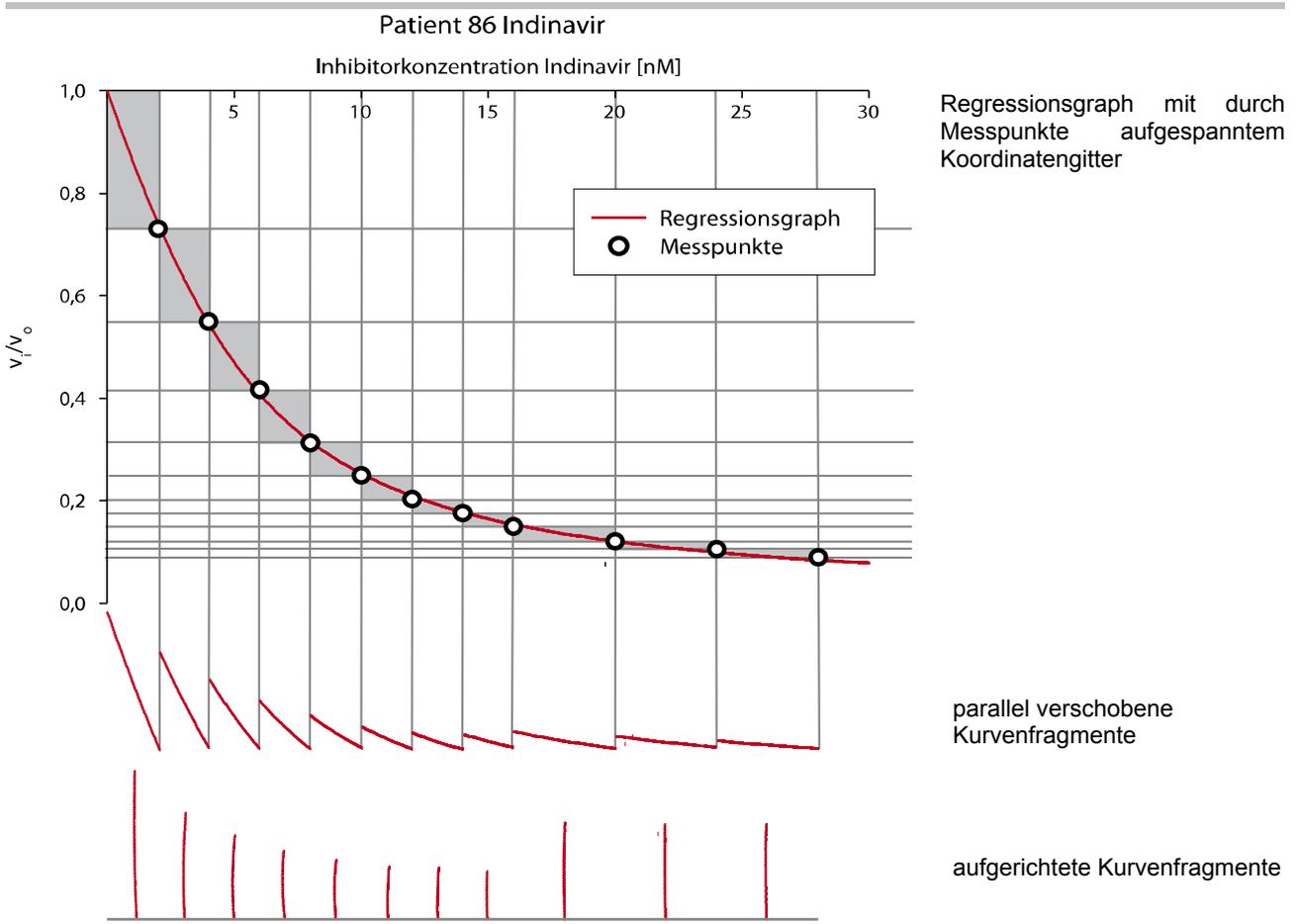
Cook's Distance (über 4) sollten versuchsweise von der Regression ausgeschlossen werden. In einigen Fällen konnte damit ein größere Homogenität der Cookschen Distanzen erzielt werden.

5.4.2.2 KONSEQUENZEN FÜR DAS LAYOUT DER MIKROTITERPLATTEN

Die Analyse der Cookschen Distanzen gab auch Hinweise für die Optimierung des Layouts der Mikrotiterplatten. Es fällt beispielsweise auf, dass Messpunkte bei niedrigeren Inhibitorkonzentration meist einen größeren Einfluss haben, als diejenigen bei hohen (Tabelle 5.6 Seite 91).

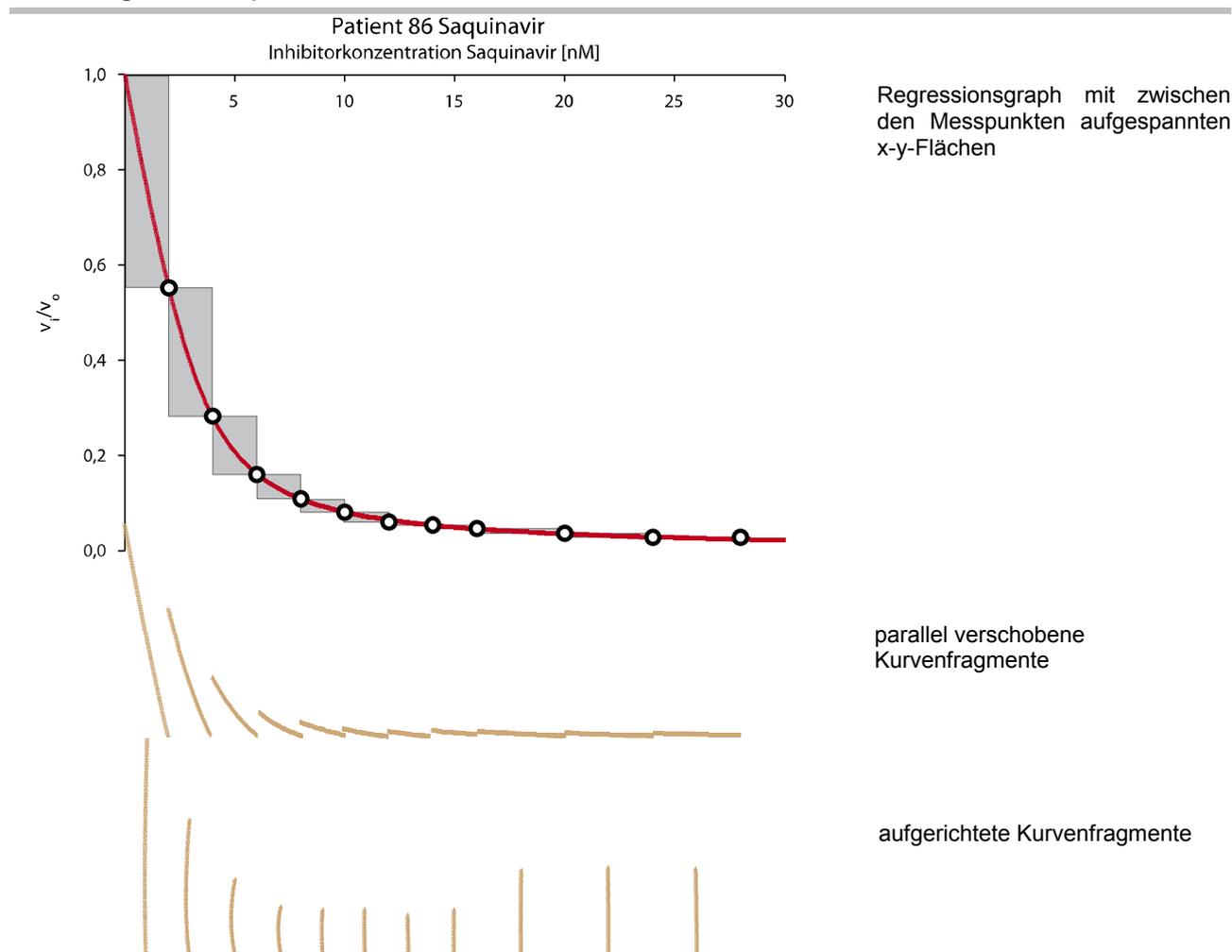
Bei der Suche nach der Ursache hilft eine anschauliche Betrachtung: Im Prinzip geht es darum die für K_i charakteristische Krümmung der Kurve möglichst gut zu erfassen. In welchem Messbereich diese Krümmung liegen wird, ist vor der Messung jedoch nicht exakt prognostizierbar. In einem stark vereinfachten bildlichen Modell gesprochen: Im optimalen Fall haben die Messpunkte auf dem Graphen ähnliche Abstände (Abbildung 5.17). Die Cookschen Distanzen liegen unter 1. Im rechten Graphen (Abbildung 5.16 Seite 91) ist die Strecke zwischen dem Messpunkt bei 2 nM Inhibitor und dem nächsten bei 4 nM Inhibitor deutlich größer, als die Abstände zwischen den anderen Punkten (Abbildung 5.18). Dieser Anteil der Kurve ist also in der Messung unterrepräsentiert. Die Cooksche Distanz des Messpunktes ist hoch.

Abbildung 5.17: Graph mit geringen Cookschen Distanz



Ein anderes, etwas komplexeres anschauliches Maß, ist der Bereich von x und y-Werten zwischen zwei Messwerten als von den Messwerten aufgespanntes Rechteck. Dieses Maß illustriert gut den hohen Einfluss von Messwerten bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen. Die Rechtecke decken im Idealfall ähnliche x-y-Flächen ab.

Abbildung 5.18: Graph mit erheblichen Cookschen Distanzen



Es sei betont, dass es sich bei den eben diskutierten Maßen lediglich um einfache, anschauliche Modelle zum besseren Verständnis der Problematik handelt. Die tatsächlich für die Berechnung der Cookschen Distanzen angewandte Methodik ist wesentlich komplexer, beruht maßgeblich auf der Analyse der Residuen und geht deutlich über das zur Anwendung notwendige Verständnis hinaus.

Aus den Überlegungen wird jedoch klar, dass es sich um die Wahrscheinlichkeit, die Charakteristika des Graphen gut zu erfassen, möglichst groß zu halten, empfiehlt:

- Die Anzahl der Messpunkte so groß wie möglich zu halten.
- Die Messpunkte im steilen Teil der Kurven (bei niedrigen Konzentrationen) dichter zu legen, als im flachen Teil bei hohen Konzentrationen. Denn durch die Steilheit der Kurve ist der Abstand der Punkte auf dem Graphen bei gleicher Distanz der Inhibitorkonzentrationen

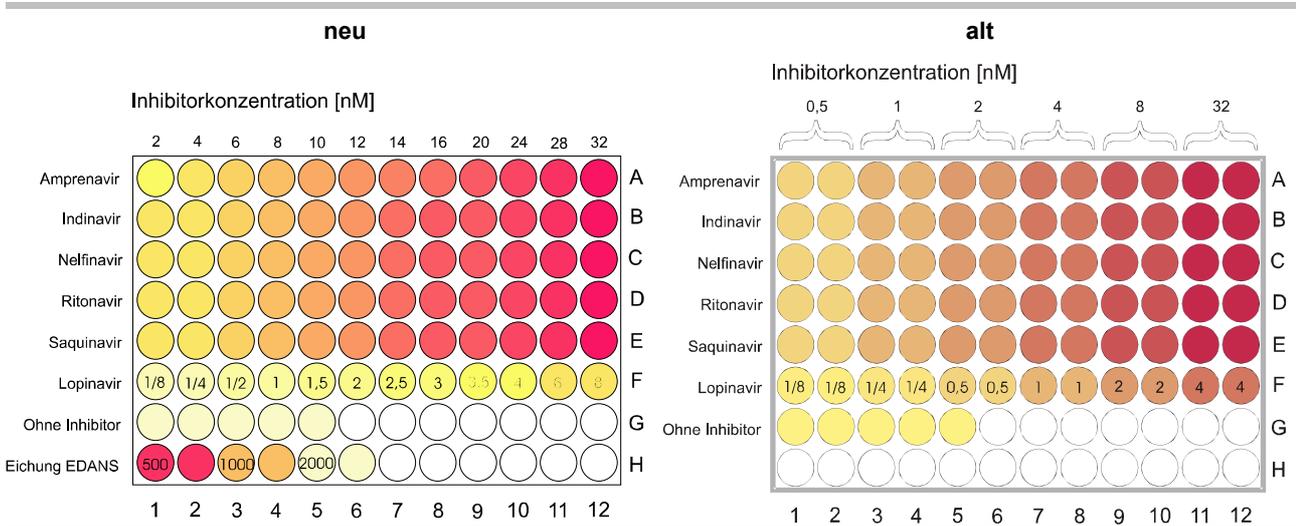
5. ERGEBNISSE

auf der Abszisse durch den „schrägen Beobachtungswinkel“ naturgemäß höher, als im Bereich der starken Inhibition mit fast parallelem Verlauf der Kurve zur Abszisse.

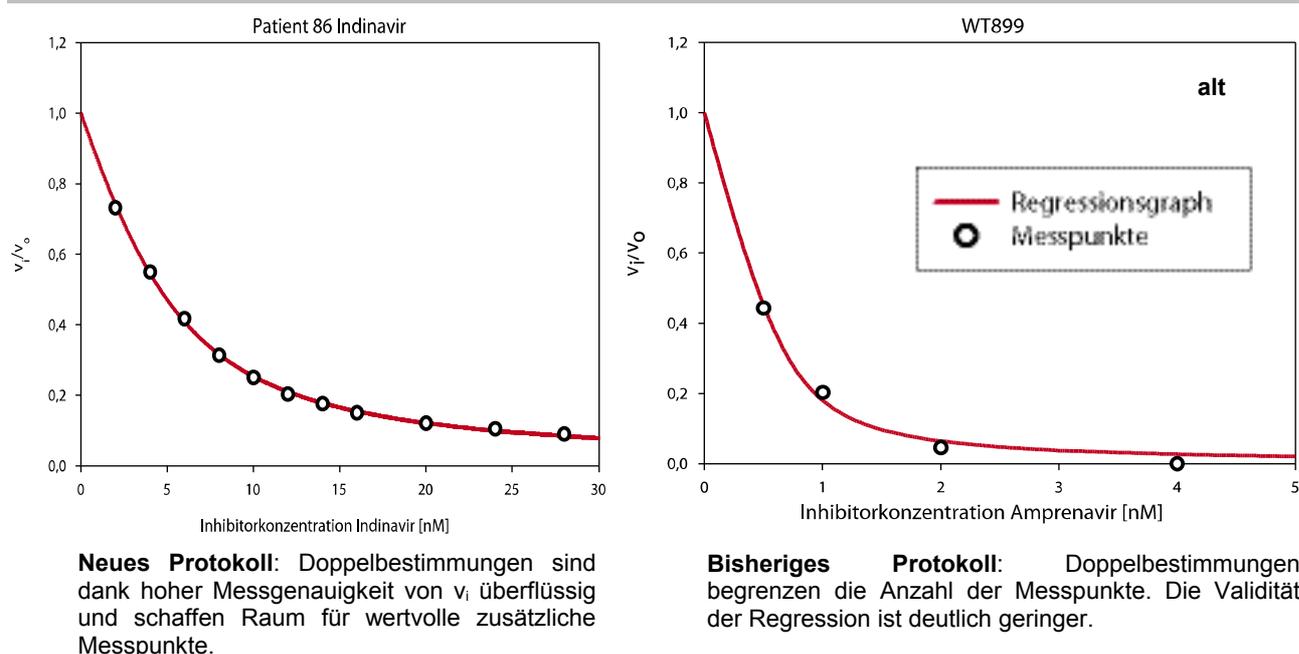
Die Qualität eines Messpunktes bemisst sich zusammenfassend durch die Präzision seiner Bestimmung in der Messung und durch seine Lage auf dem Graphen sowie der Position zu den übrigen Messpunkten. Maßstab hierfür sind u. a. der Korrelationskoeffizient R und die Cooksche Distanz.

Wie in Kapitel 5.4.1.2.2.2 (Seite 83) gezeigt, gehört die Geschwindigkeit des Substratumsatzes zu den verlässlichsten Größen des Assays. Der Informationsgewinn durch die bisher üblichen Doppelbestimmungen ist deshalb gering. Die Doppelbestimmungen wurden durch zusätzliche Messpunkte ersetzt.

Abbildung 5.19: Verändertes Layout der Mikrotiterplatten



Die Validität der nicht linearen Regressionsanalyse konnte dadurch entscheidend gesteigert werden, was sich schon rein optisch in der guten Anpassbarkeit der Regressionskurven widerspiegelt.

Abbildung 5.20: Größere Validität der Regressionsanalyse durch mehr Messpunkte

5.4.2.3 GEWICHTETE REGRESSION

Der Marquardt-Levenberg-Algorithmus geht bei seiner Berechnung von der Gleichwertigkeit aller Messpunkte aus. Diese Annahme trifft nicht zu.

Eine Möglichkeit diese Tatsache zu berücksichtigen, ist eine gezielte Gewichtung der Daten. Messpunkten können gemäß ihrer Korrelationskoeffizienten und Cookschen Distanzen bei der Regression unterschiedlich stark berücksichtigt werden. Dieses Vorgehen ist eine interessante Alternative zur bisher praktizierten Methode des intuitiven Streichens unplausibler Messpunkte.

5.5 WEITERENTWICKLUNG DES RECHENMODELLS

Während das Verfahren der rekombinanten Herstellung von Protease bereits als reif für den Einsatz in der Routinediagnostik angesehen werden kann und grundlegende Verbesserungen nur durch den Einsatz neuer Methoden, wie in vitro Translationssystemen, zu erwarten sind, mussten bei der Auswertung der Messergebnisse noch einige Schwierigkeiten gelöst werden. Dazu gehören

- die Eliminierung logischer Inkonsistenzen und genauere Modellierung der tatsächlichen Bedingungen des Assays.
- die Entwicklung eines standardisierten Auswerte-Algorithmus um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.
- die Beschleunigung der Auswertung durch Automatisierung
- die Kompensation häufiger systematischer Fehler.

Um Reproduzierbarkeit und Qualitätskontrolle gewährleisten zu können, schien es insbesondere hinsichtlich des geplanten Einsatzes des Tests in der Routinediagnostik dringend notwendig, einen genau definierten Algorithmus der Berechnung festzulegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Rechenmodell entwickelt, das die Gegebenheiten des Assays realitätsgetreuer widerspiegelt, einen größeren Anteil der erhobenen Messdaten in die Berechnung von E und K_i einbezieht und die Abläufe standardisiert.

Diese Verbesserungen werden durch den Einsatz eines Verfahrens möglich, das zumeist als *multiple Regression* (engl. *multiple regression*) oder *globale Regression* (engl. *global regression*) bezeichnet wird.

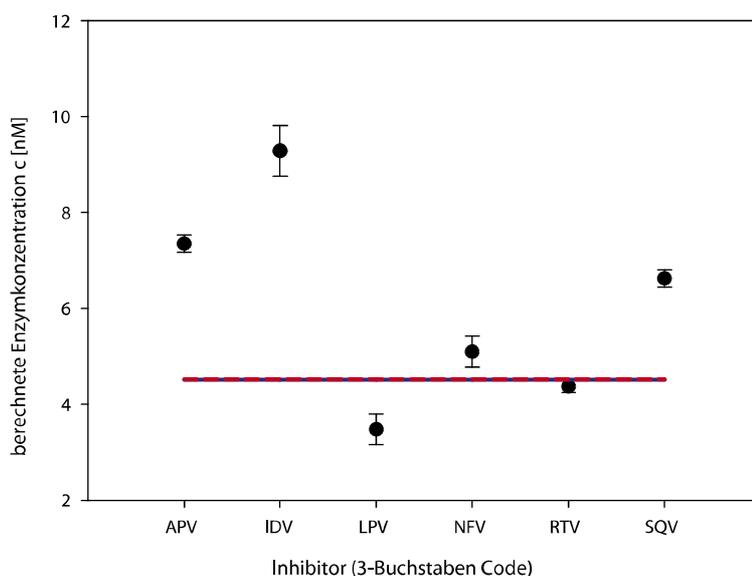
Die mit dem neuen Verfahren kalkulierten Enzymkonzentrationen stimmen gut mit in Titrationsanalysen bestimmten Konzentrationen überein. Die bisher oft unvermeidlichen, aufwändigen Titrationsanalysen werden damit weitgehend überflüssig.

5.5.1 EINFACHE REGRESSION VERSUS MULTIPLE REGRESSION

Ein wesentliches Problem der bisher eingesetzten einfachen nichtlinearen Regression erwächst aus der Schwierigkeit, die aktive Enzymkonzentration $[E]$ zu bestimmen. Wird $[E]$ nicht in einer aufwändigen Titrationsanalyse bestimmt, ist man gezwungen $[E]$ als zweite Variable in der allgemeinen Formel 4.4 zu belassen. Berechnet man die Inhibitionskonstante K_i nun für jeden Inhibitor einzeln und mit individuell variabler Enzymkonzentration $[E]$, stellt man fest, dass die berechneten Enzymkonzentrationen teilweise erheblich schwanken, obwohl in jedes Well die gleich Enzymmenge zugegeben wurde, die Konzentration also per definitionem konstant ist. (Abbildung 5.21)

Abbildung 5.21: Fiktive Streuung der Enzymkonzentration

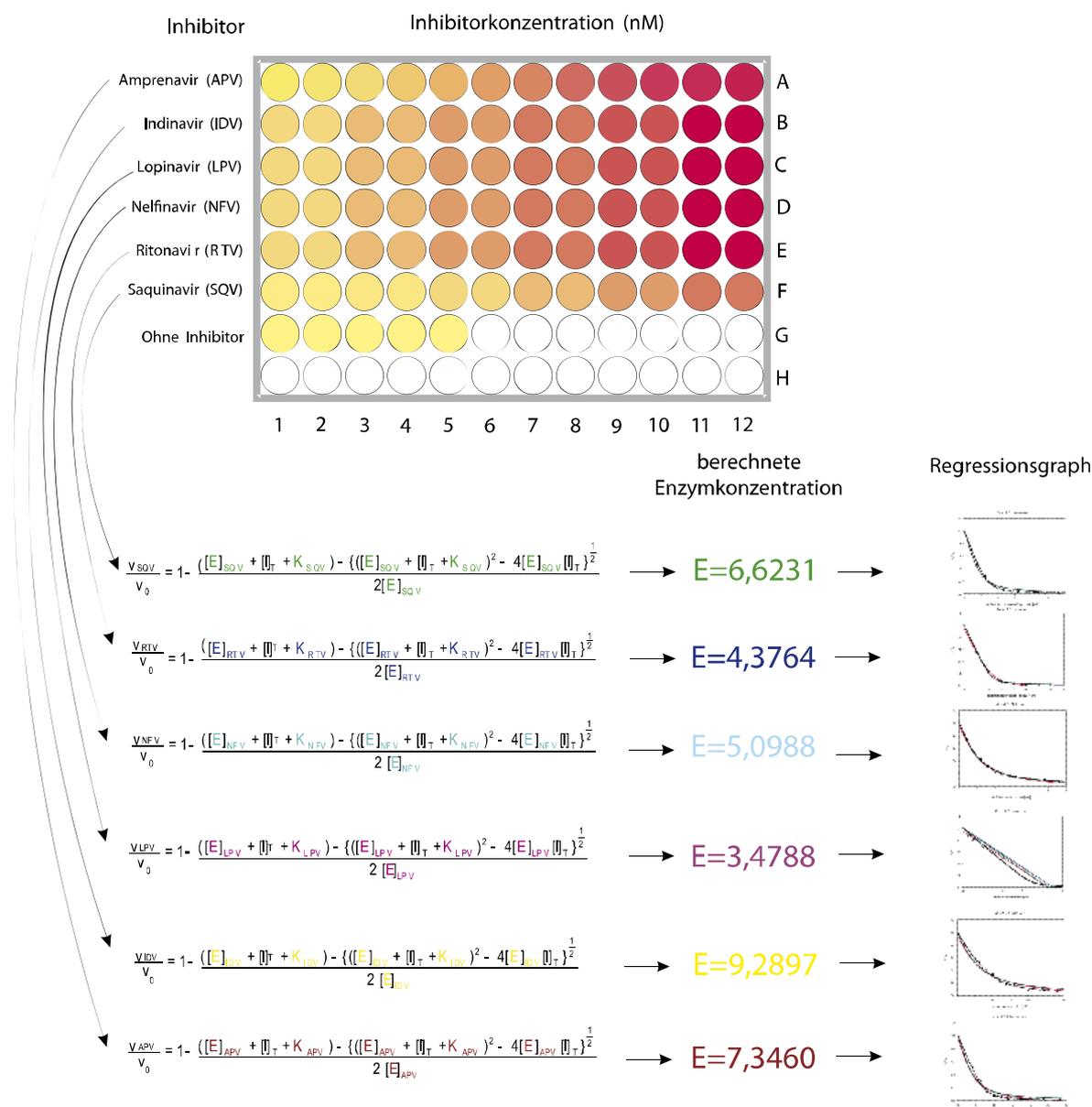
fiktive Schwankungen der Enzymkonzentration bei einfacher Regression
(Beispiel anhand Patient 73)



Fiktive Schwankung der Enzymkonzentration bei für jeden Inhibitor einzeln berechnetem Regressionsgraphen. Die blau beziehungsweise nahezu deckungsgleiche rote Linie zeigt die mittels Titration bzw. multipler Regressionsanalyse für alle Inhibitoren berechnete Enzymkonzentration.

Dieses fiktive Schwanken der Enzymkonzentration steht im Widerspruch zur Realität, in der die Konzentration aktiven Enzyms zwar nicht bekannt, aber in allen Wells identisch ist. Abbildung 5.22 illustriert das bisherige Rechenmodell.

Abbildung 5.22: Separate Regression



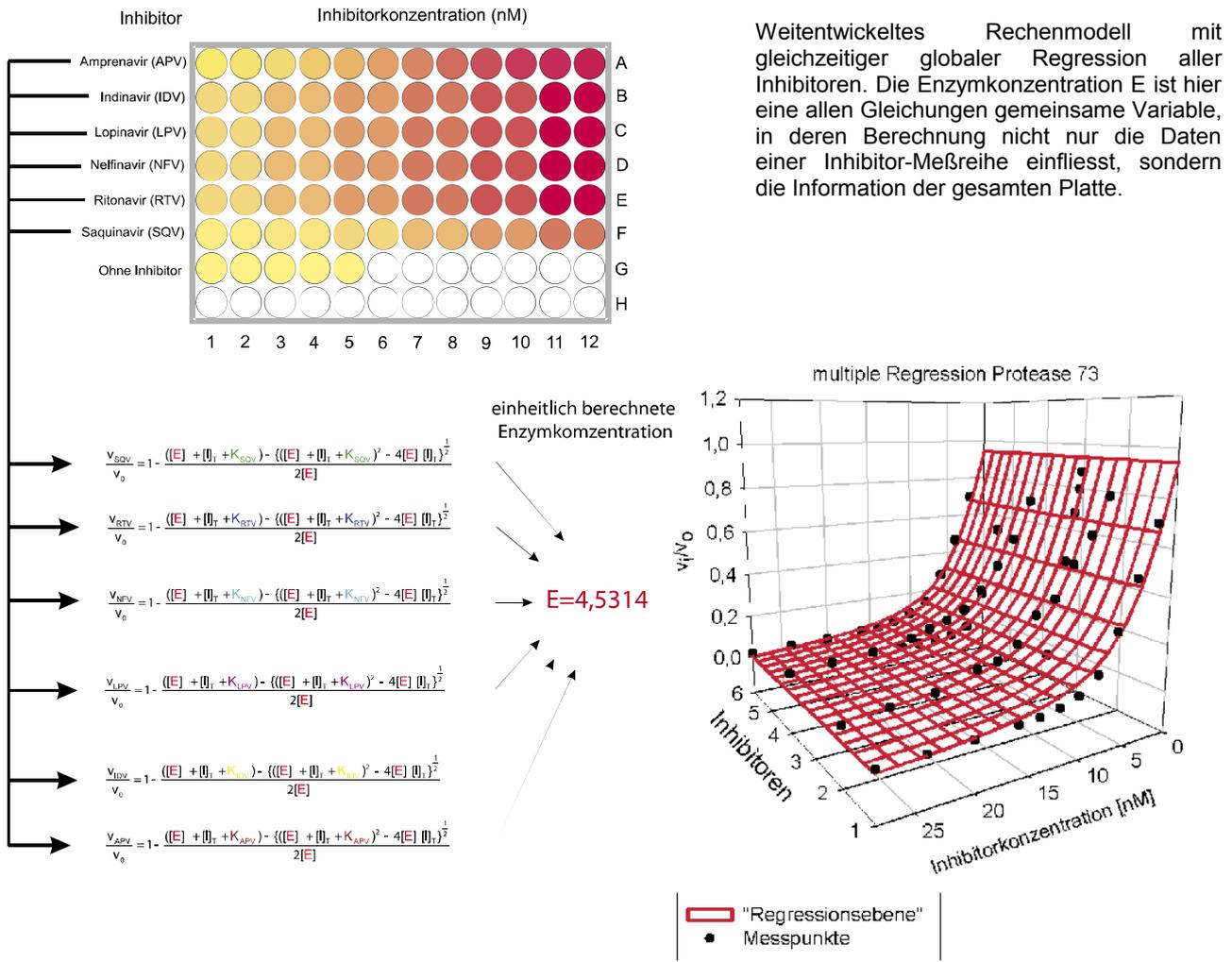
Beim bisherigen Verfahren werden die Enzymkonzentrationen für jeden Inhibitor (waagrechte Messreihe auf der Platte) unabhängig voneinander berechnet. Im Widerspruch zu den tatsächlichen Gegebenheiten werden dabei unterschiedliche Enzymkonzentrationen kalkuliert, obwohl die Menge aktiven Enzyms in allen Wells identisch ist.

Abhilfe schafft ein weiterentwickeltes Modell, das auf multipler Regressionsanalyse basiert. Dabei werden die Graphen nicht mehr für jeden Inhibitor einzeln an die Messwerte angepasst, sondern für alle Inhibitoren gleichzeitig. Statt in 6 unabhängigen nichtlinearen Regressionsanalysen, werden die Gleichungen aller Inhibitoren parallel in einem universellen Ansatz gelöst. Die Enzymkonzentration wird als eine einheitliche, allen Gleichungen gemeinsame Variable definiert. Der in allen Wells konstanten Enzymkonzentration wird damit Rechnung getragen.

5. ERGEBNISSE

Ein weiterer Vorteil ist, dass in die Berechnung von $[E]_0$ nicht mehr nur die Ergebnisse der Messreihe eines einzelnen Inhibitors einfließen, sondern die Messdaten aller Inhibitoren. Die für die Berechnung der Inhibitionskonstanten K_i bedeutende Variable $[E]_0$ wird damit auf eine breitere und somit solidere Basis gestellt.

Abbildung 5.23: Gleichzeitige, multiple Regression für alle Inhibitoren

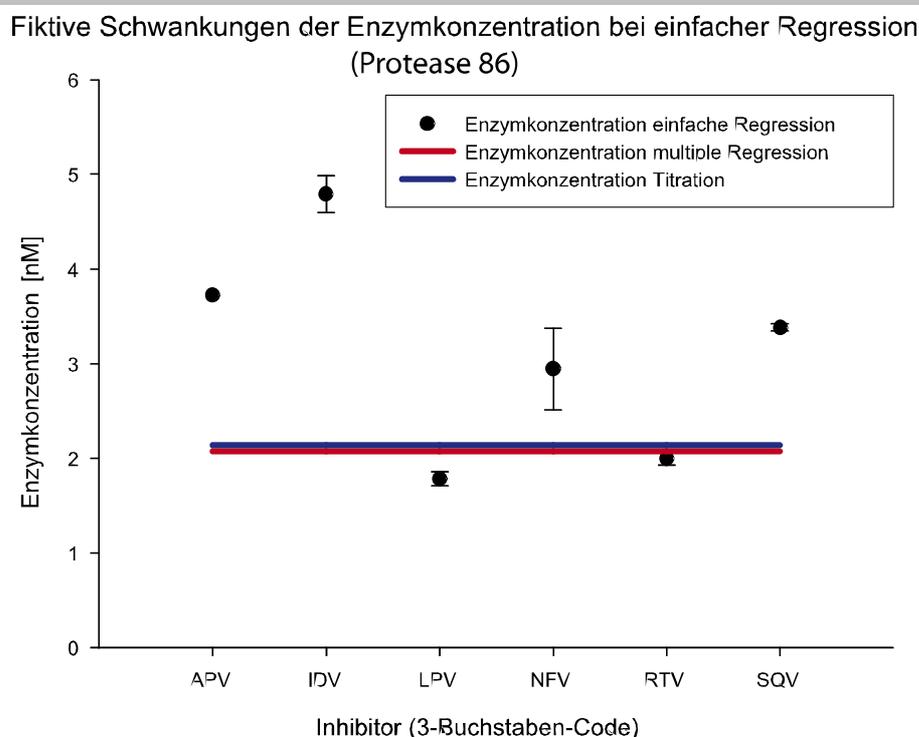


Die globale Regressionsanalyse wird – bildlich gesprochen – im Vergleich zur einfachen Regression in der nächsthöheren Dimension durchgeführt. Stellt man sich die einfache nichtlineare Regression zweidimensional in einem ebenen Koordinatensystem vor, kann man sich die globale Regression im dreidimensionalen Raum denken. An die Stelle einzelner Regressionsgraphen tritt eine Graphenschar mit der Enzymkonzentration $[E]_0$ als gemeinsamer Variable. Die Schar von Regressionsgraphen wird von SigmaPlot grafisch als Regressionsebene dargestellt. Auch wenn das mathematisch nicht ganz korrekt ist⁹⁹, wird so dennoch gut der parallele Regressionsansatz illustriert.

⁹⁹Genau genommen ist die graphische Darstellung der multiplen Regression von SigmaPlot mathematisch nicht korrekt. Es handelt sich in diesem Fall nicht wirklich um eine Regressionsebene im strengen Sinn, da die Achse der Inhibitoren per definitionem nominal skaliert ist. Die Punkte im Raum zwischen zwei benachbarten Regressionsgraphen sind somit nicht definiert. Exakt wäre also eine Schar von Kurven durch die Messpunkte. Da aber der parallele Ansatz der **multiplen**, bzw. oftmals auch als **global** bezeichneten, Regression in der von SigmaPlot ausgegebenen Graphik unserer Ansicht nach gut zum Ausdruck kommt, haben wir sie trotzdem übernommen.

Es zeigte sich, dass die mit dem weiterentwickelten Rechenmodell errechneten Enzymkonzentrationen gut mit den in Titrationsanalysen gemessenen Werten übereinstimmen. Die aufwändigen, materialintensiven Titrationsanalysen können so durch eine Berechnung ersetzt werden.

Abbildung 5.24: Übereinstimmung zwischen Titrationsmessungen und neuem Rechenmodell

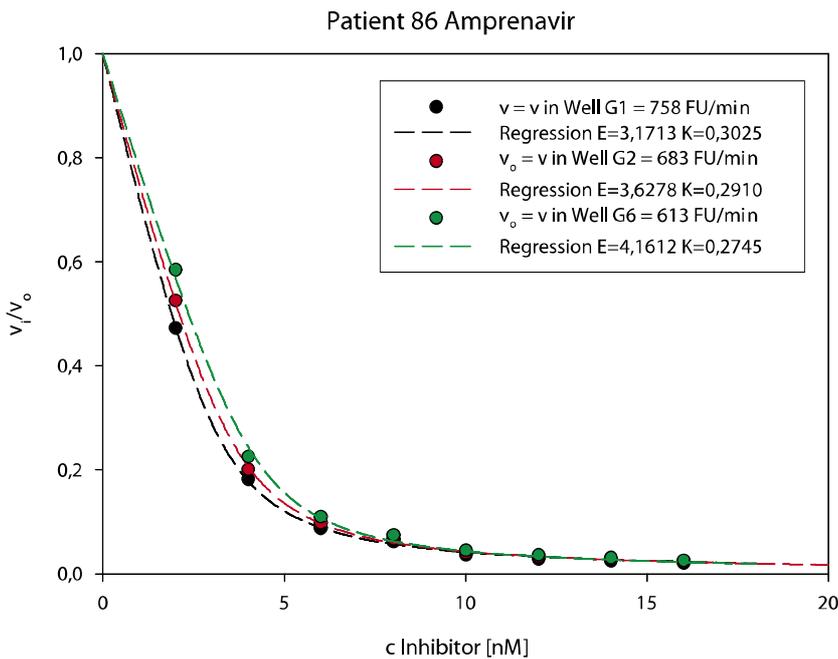


5.5.2 KORREKTUR SYSTEMATISCHER FEHLER BEI MULTIPLER REGRESSION

Die globale Regression mit gemeinsamen Variablen für alle Gleichungen eröffnet die Möglichkeit, systematische Fehler zu korrigieren. Korrekturterme müssen als allen Gleichungen gemeinsame Variable integriert werden. Auf diese Weise wird garantiert, dass nur systematische Fehler, die alle Resistenzmessungen gleich beeinflussen vom Korrekturterm erfasst werden. Bei einfacher Regression würde der Korrekturterm durch Schaffung weiterer, für jeden Inhibitor individueller, Freiheitsgerade – ähnlich der fiktiven Schwankung der Enzymkonzentration – einen artifiziellen Fehler etablieren.

Um die Möglichkeiten eines solchen Korrekturterms auszuloten, wurde ein Summand integriert, der systematische Fehler im Stoffumsatz und dadurch im Quotienten $\frac{v_i}{v_0}$, also Verschiebungen der Messwerte, ausgleichen soll. Dabei handelt es sich um ein stark vereinfachtes Modell, da der Summand lediglich reine Verschiebungen in Richtung der Ordinate modelliert. Tatsächlich kommt es, wegen des Quotienten $\frac{v_i}{v_0}$, zu wesentlich komplexeren Verschiebungen.

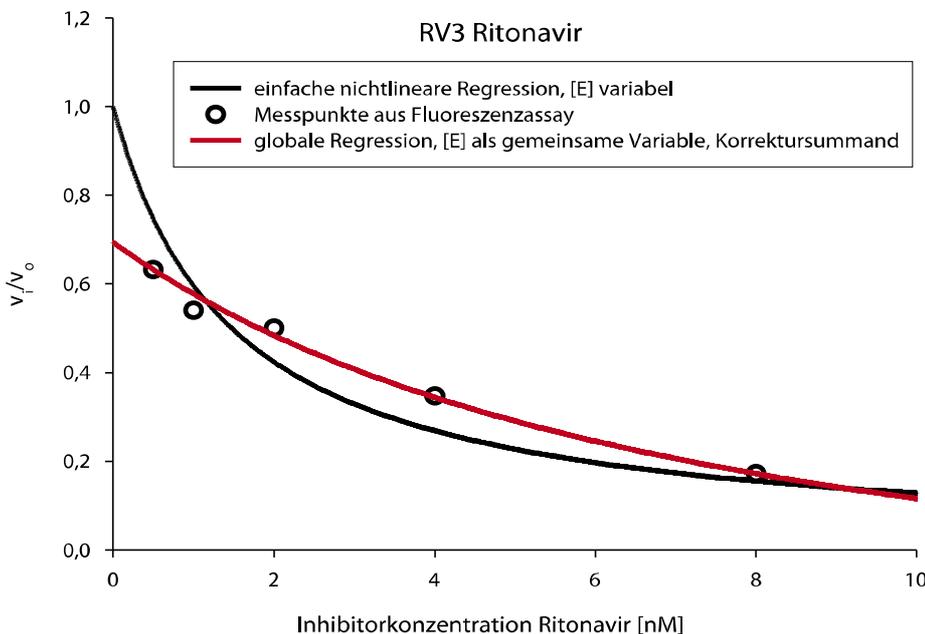
Abbildung 5.25: Auswirkung systematischer Fehler in v



Bei jedem der 3 Graphen in der Abbildung links wurde der Stoffumsatz in Abwesenheit von Inhibitoren gemäß der Messung eines einzelnen Wells als Nenner in den Quotienten v_i/v_0 eingesetzt. Regulär wird der Mittelwert aus mehreren Messungen als v_0 -Referenz verwendet. Die Graphen werden dementsprechend systematisch verzerrt. Wie zu erkennen ist, hängt das Ausmaß der Verzerrung von der jeweiligen Inhibitorkonzentration ab und entspricht **nicht** einer reinen Verschiebung in Richtung Ordinate.

Selbst das vergleichsweise einfache Modell eines Korrektursummanden kann systematische Fehler in der Praxis erstaunlich gut kompensieren.

Abbildung 5.26: Effekt des Korrektursummanden auf die Regressionsanalyse



5.6 ERGEBNISSE DER RESISTENZMESSUNG

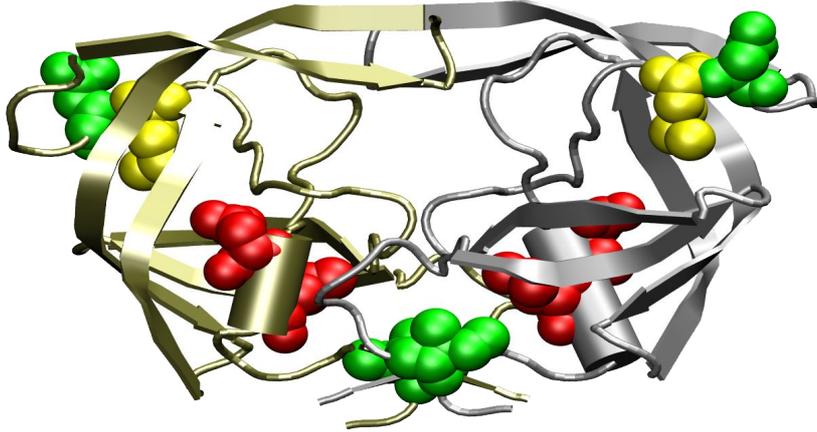
Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht der Resultate der enzymkinetischen Messungen. Vorangestellt ist jeweils eine Kurzcharakterisierung der gemessenen Protease. Ein Molekülmodell illustriert die Position der Mutationen.

Für jede Protease sind die Ergebnisse genotypischer Prognosen, die Resultate des phänotypischen Assays des Max von Pettenkofer-Institutes unter Anwendung verschiedener Rechenmodelle, etwaig vorhandene Resistenzfaktoren des zellkulturbasierten phänotypischen Assays der Universität Leuven (Belgien) sowie Daten der Literatur tabellarisch zusammengefasst.

Dabei wurden in der Tabelle – entsprechend dem im Rahmen dieser Arbeit festgelegten technischen Schwellenwert (Kapitel 5.2.5 Seite 74) – Resistenzfaktoren > 3 als Resistenz angesehen und rot hinterlegt, geringere Resistenzfaktoren als Empfindlichkeit gegenüber dem Inhibitor eingestuft und grün markiert.

Die genotypischen Prognosen wurden erstmals 2003 erstellt und 2006 aktualisiert. Der Vergleich der Prognosen von 2003 mit denen von 2006 lässt insbesondere bei den Proteasen mit einem intermediären Resistenzprofil deutliche Unterschiede erkennen.

Abbildung 5.27: Resistenzfaktoren Protease 73



73

intermediäres Resistenzprofil

bedeutende Mutationen (rot):

N88Y, L90M

geringfügige Mutationen (gelb):

M36I

andere Mutation (grün):

I3V, N37S

73	2006		2006					
	Genotyp HIVdb <i>classification</i>	geno2pheno <i>decision tree</i>	<i>SVM</i>	<i>RF</i>	Phänotyp MvP			
					<i>mEvar+t</i>	<i>mEvar</i>	<i>mEtit</i>	<i>sEvar</i>
APV	low-level	susceptible	susceptible	2,3	6,7	4,5	4,2	1,4
IDV	low-level	resistant	resistant	6,7	7,5	5,6	5,5	2,8
LPV	potential low level	susceptible	susceptible	1,7	0	0	0	0,5
NFV	high-level	resistant	susceptible	5,2	4,3	3,1	3	2,8
RTV	low-level	resistant	resistant	4,3	1,4	0,6	0,5	0,6
SQV	intermediate	resistant	susceptible	4	6,7	4,4	4,1	2

73	2003		2003	
	Genotyp HIVdb <i>classification</i>	geno2pheno <i>decision tree</i>	<i>SVM</i>	<i>RF</i>
APV	low-level	susceptible	susceptible	1,5
IDV	low-level	resistant	susceptible	3,4
LPV	potential low level	susceptible	susceptible	1,5
NFV	high-level	resistant	resistant	3,6
RTV	low-level	resistant	susceptible	2,8
SQV	intermediate	resistant	susceptible	3,7

Abkürzungen:

Inhibitoren der HIV Protease

APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

HIVdb Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität <http://hivdb.stanford.edu>
 geno2pheno über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose <http://www.geno2pheno.org>
 decision tree Entscheidungsbaum-Klassifikation
 SVM Vektor-Maschinen-Klassifikation
 RF auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

Resistenzfaktoren nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
 mEvar+t multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
 mEvar multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
 s/mEtit einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
 sEvar herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen

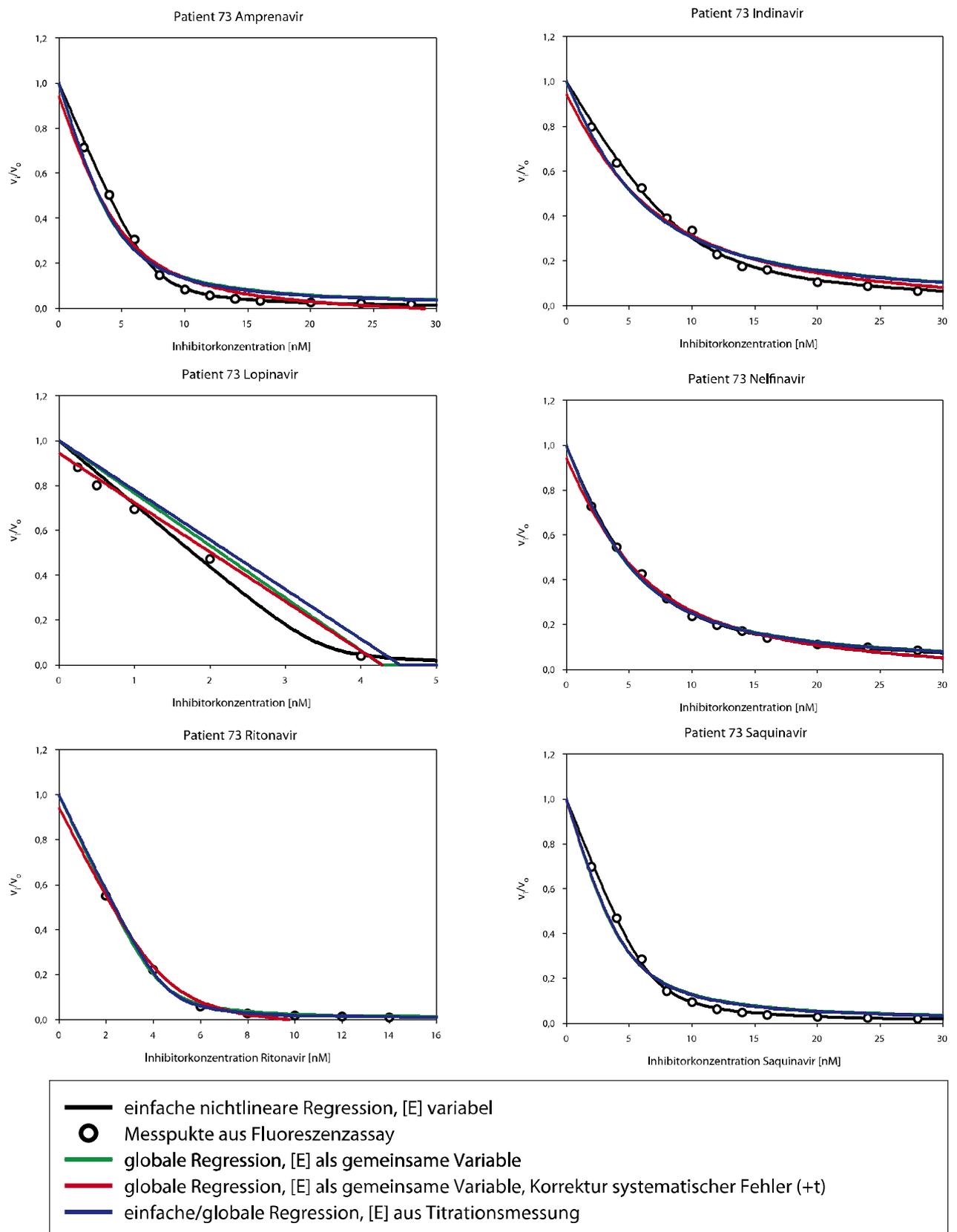
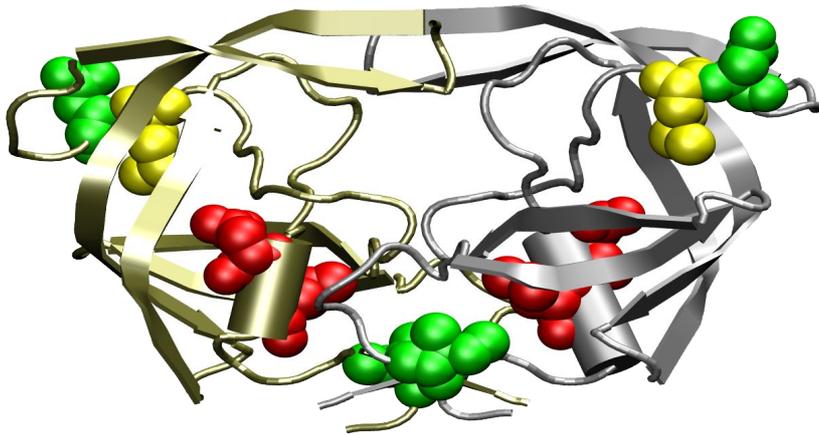
Abbildung 5.28: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 73

Abbildung 5.29: Resistenzfaktoren Protease 86



86
intermediäres Resistenzprofil
 bedeutende Mutationen (rot):
keine
 geringfügige Mutationen (gelb):
K20T, L63P, A71V, I93L
 andere Mutation (grün):
I3V, N37S

86

	2006 Genotyp HIVdb <i>classification</i>	2006 geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF	2006 Phänotyp MvP <i>mEvar+t</i>	<i>mEvar</i>	<i>mEtit</i>	<i>sEvar</i>
APV	susceptible	susceptible	susceptible	-0,4	4,1	3,1	2,9	1,4
IDV	susceptible	susceptible	susceptible	2,3	6,8	5,6	5,5	4,1
LPV	susceptible	susceptible	susceptible	2,4	0,1	0,1	0	0,7
NFV	susceptible	susceptible	susceptible	2,6	6,5	5,4	5,3	4,8
RTV	susceptible	susceptible	susceptible	1,7	0,8	0,6	0,4	0,5
SQV	susceptible	susceptible	susceptible	1,3	5,9	4,5	4,3	2,8

86

	2003 Genotyp HIVdb <i>classification</i>	2003 geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF
APV	susceptible	susceptible	susceptible	0,7
IDV	susceptible	susceptible	resistant	3,7
LPV	susceptible	susceptible	susceptible	1,7
NFV	susceptible	susceptible	susceptible	4,6
RTV	susceptible	susceptible	susceptible	1,9
SQV	susceptible	susceptible	susceptible	3,5

Abkürzungen:

Inhibitoren der HIV Protease

APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

HIVdb Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität <http://hivdb.stanford.edu>
 geno2pheno über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose <http://www.geno2pheno.org>
 decision tree Entscheidungsbaum-Klassifikation
 SVM Vektor-Maschinen-Klassifikation
 RF auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

Resistenzfaktoren nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
 mEvar+t multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
 mEvar multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
 s/mEtit einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
 sEvar herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen

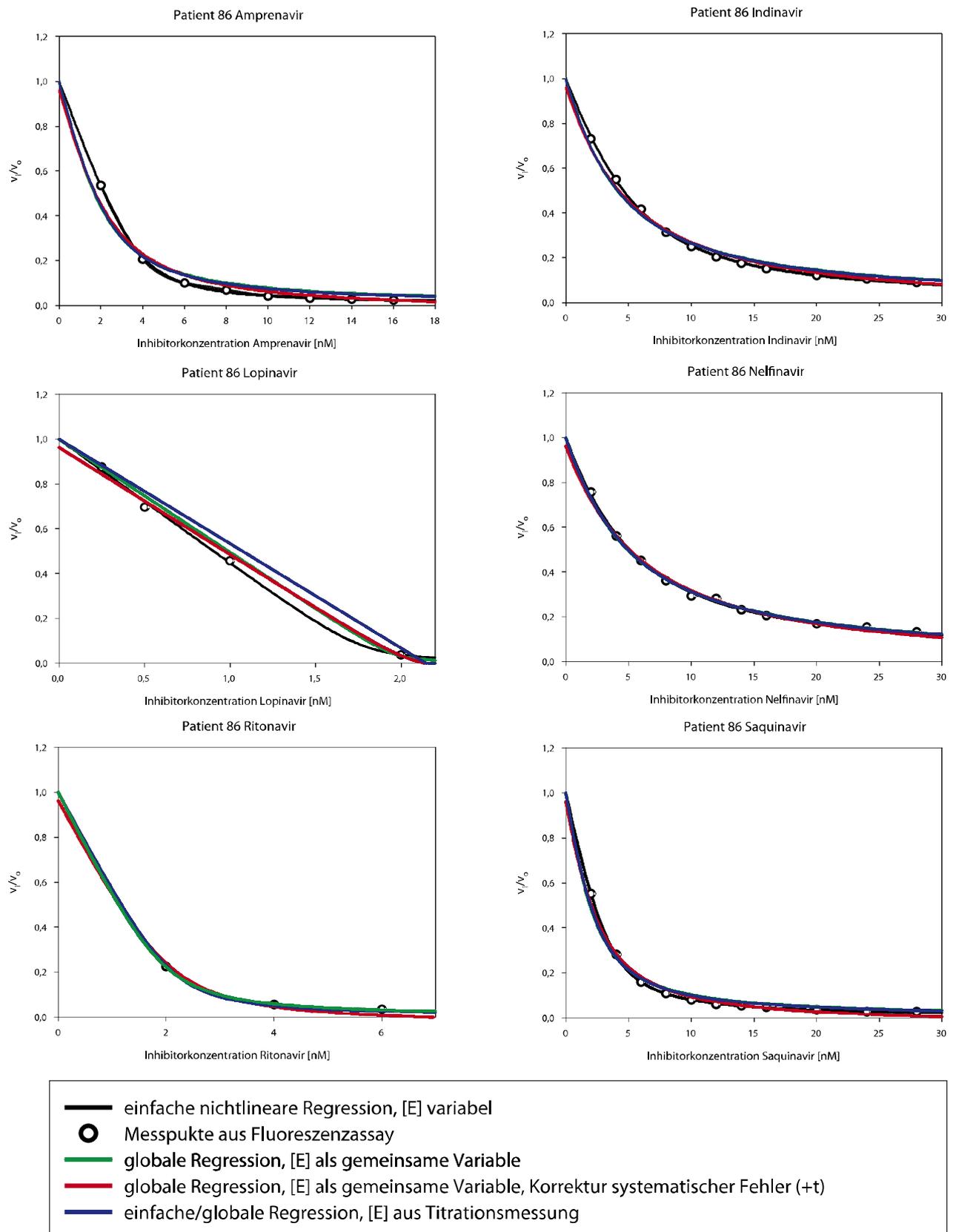
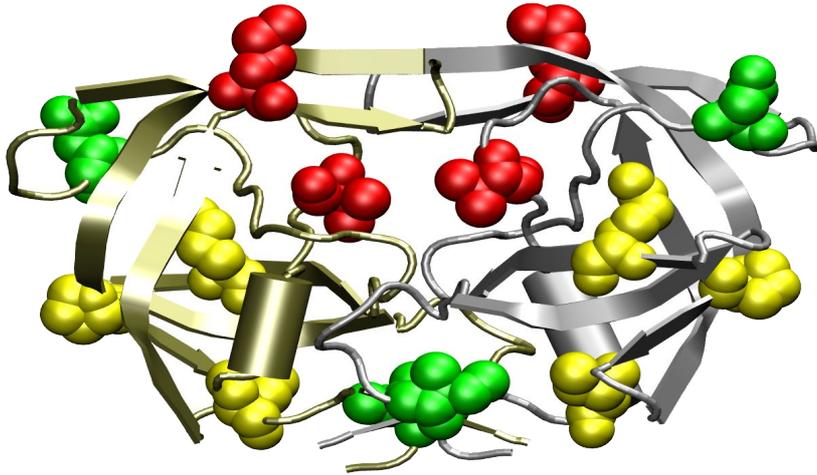
Abbildung 5.30: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 86

Abbildung 5.31: Resistenzfaktoren Protease 174



174

intermediäres Resistenzprofil

bedeutende Mutationen (rot):

M46I, V82A

geringfügige Mutationen (gelb):

K20T, L63P, I93L

andere Mutation (grün):

I3V, N37S

174

	2006 Genotyp HIVdb <i>classification</i>	2006 geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF	2006 Phänotyp MvP <i>mEvar+t</i>	<i>mEvar</i>	<i>mEtit</i>	<i>sEvar</i>
APV	low-level	resistant	resistant	2,7	6,8	4,8	4,8	2,6
IDV	intermediate	susceptible	susceptible	7,3	12,7	9,6	9,6	9,2
LPV	intermediate	susceptible	resistant	8,8	1,3	0,8	0,9	1,8
NFV	high-level	resistant	resistant	4,6	8,2	6,2	6,2	7,2
RTV	intermediate	resistant	resistant	7,5	3	1,8	1,9	1,9
SQV	low-level	susceptible	susceptible	2	5,3	3,6	3,7	1,8

174

	2003 Genotyp HIVdb <i>classification</i>	2003 geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF
APV	intermediate	resistant	resistant	2,3
IDV	intermediate	susceptible	resistant	6,7
LPV	low-level	susceptible	resistant	1,7
NFV	high-level	resistant	resistant	5,2
RTV	intermediate	resistant	resistant	4,3
SQV	low-level	susceptible	susceptible	4

Abkürzungen:

Inhibitoren der HIV Protease

APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

HIVdb Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität <http://hivdb.stanford.edu>
 geno2pheno über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose <http://www.geno2pheno.org>
 decision tree Entscheidungsbaum-Klassifikation
 SVM Vektor-Maschinen-Klassifikation
 RF auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

Resistenzfaktoren nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
 mEvar+t multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
 mEvar multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
 s/mEtit einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
 sEvar herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen

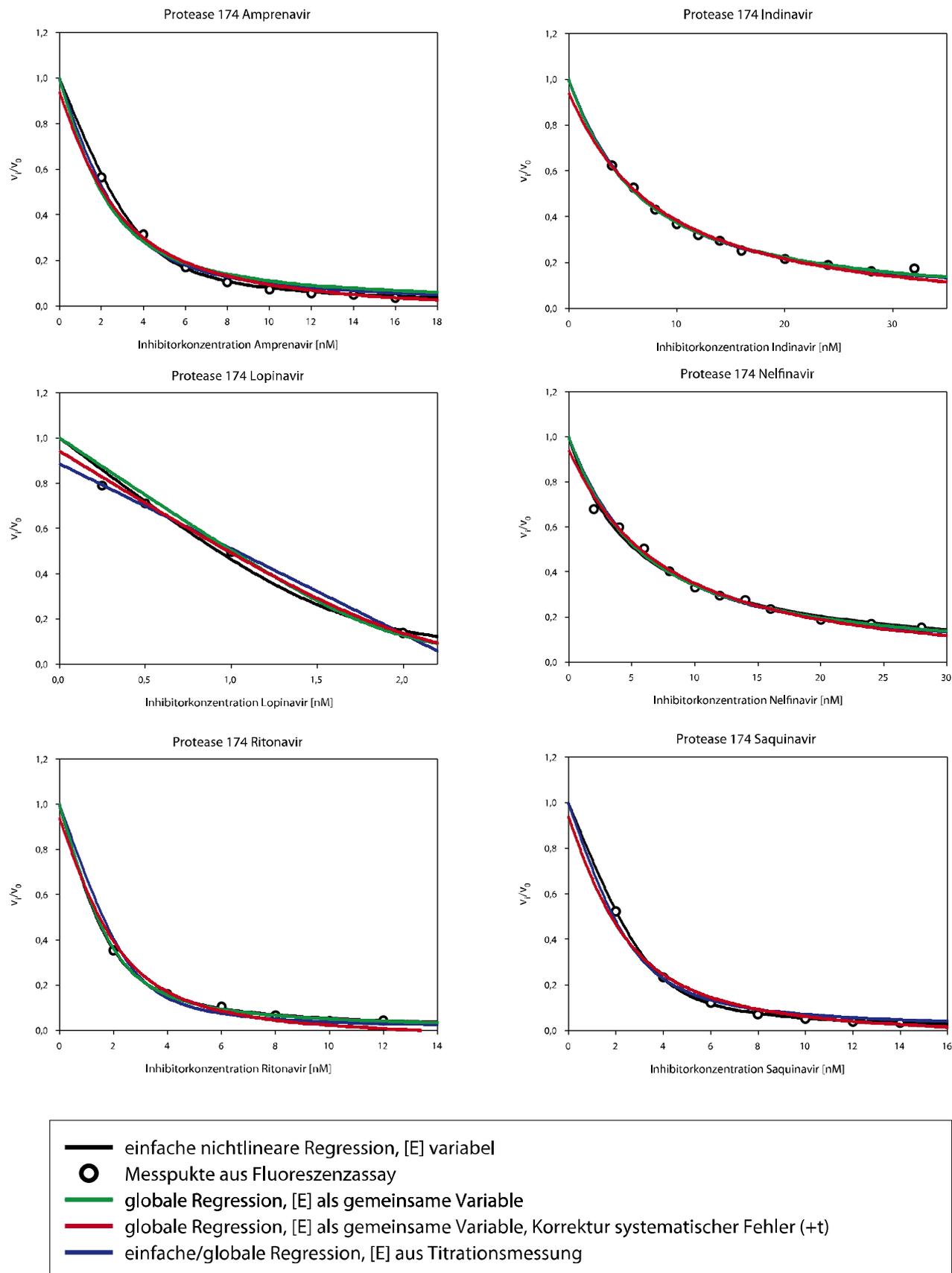
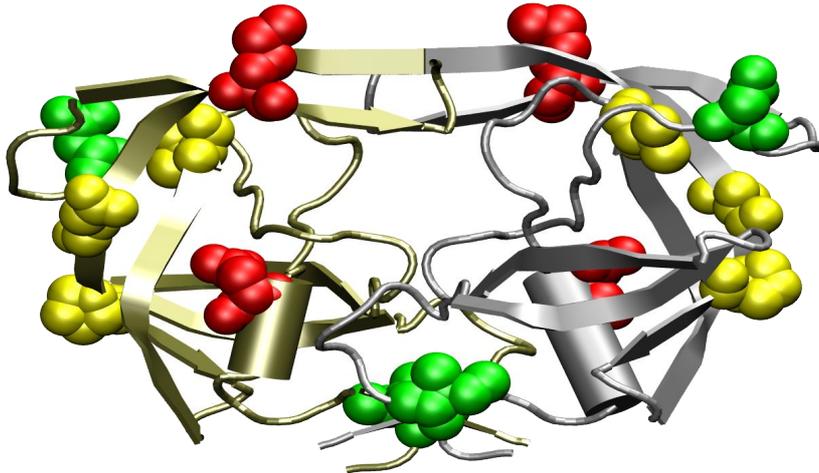
Abbildung 5.32: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 174

Abbildung 5.33: Berechnung von Resistenzfaktoren mit verschiedenen Modellen: RV1



RV1

intermediäres Resistenzprofil

bedeutende Mutationen (rot):

M46I, N88S

geringfügige Mutationen (gelb):

D60E, L63P, V77I

andere Mutation (grün):

I3V, N37S

RV1	2006	2006	2002		2002	2006	
	Genotyp HIVdb <i>classification</i>	geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF	Phänotyp German NRC <i>Beerenwinkel</i>	Leuven/Virco <i>Margot</i>	MvP <i>mEvar+t</i> <i>sEvar</i>
APV	susceptible	resistant	susceptible	1,9		0,3	2,3 1,5
IDV	low-level	resistant	susceptible	4,5	10	12,7	1,6 1,4
LPV	pot. low level	susceptible	susceptible	3,4			5,5 3,3
NFV	high-level	resistant	resistant	5	14	48,6	2,1 1,7
RTV	pot. low level	susceptible	susceptible	2,7	2	1,4	1,5 0,4
SQV	pot. low level	susceptible	susceptible	1,9	2	1,9	2,3 1,7

RV1	2003	2003		
Genotyp HIVdb <i>classification</i>	geno2pheno <i>decision tree</i>	SVM	RF	
APV	pot. low-level	resistant	susceptible	2,5
IDV	low-level	resistant	resistant	5,2
LPV	low-level			
NFV	intermediate	resistant	resistant	6,9
RTV	low-level	susceptible	susceptible	2
SQV	pot. low-level	susceptible	susceptible	2,5

Abkürzungen:

Inhibitoren der HIV Protease

APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

- HIVdb Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität <http://hivdb.stanford.edu>
- geno2pheno über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose <http://www.geno2pheno.org>
- decision tree Entscheidungsbaum-Klassifikation
- SVM Vektor-Maschinen-Klassifikation
- RF auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

- Resistenzfaktoren nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
- mEvar+t multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
- mEvar multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
- s/mEtit einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
- sEvar herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen
- Referenzen German NRC (Beerenwinkel et al. 2002a), Virco (Margot et al. 2002)

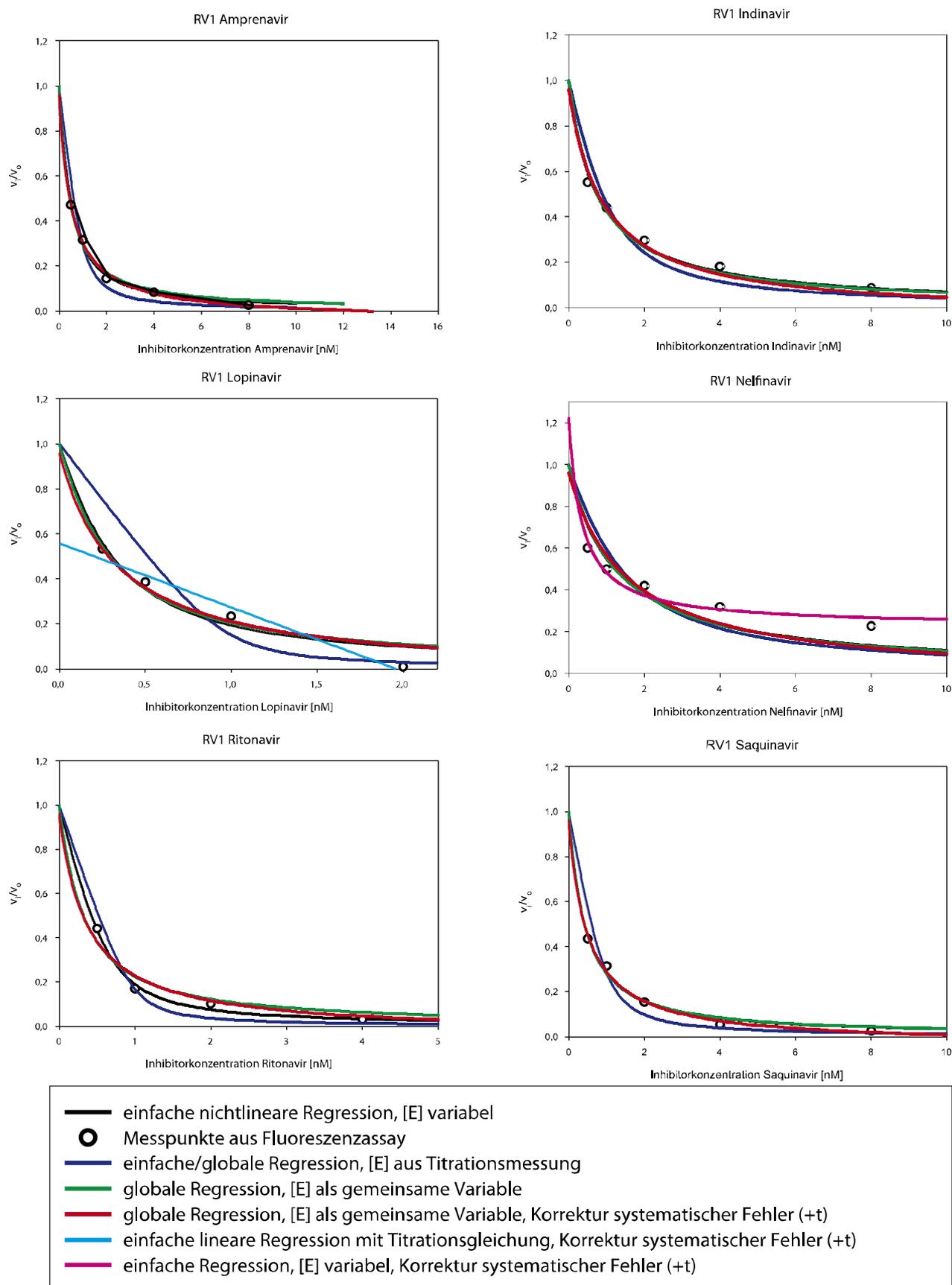
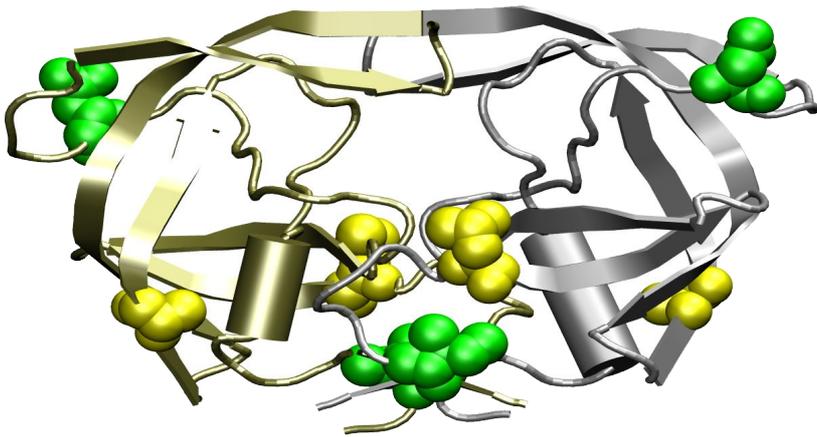
Abbildung 5.34: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV1

Abbildung 5.35: Resistenzfaktoren Protease RV2



RV2
 niedriges Resistenzprofil
 bedeutende Mutationen (rot):
keine
 geringfügige Mutationen (gelb):
L10I, A71T
 andere Mutation (grün):
I3V, N37S

RV2	2006	2006	1998							2006	2006
Genotyp	Phänotyp		Phänotyp								
HIVdb classification	geno2pheno decision tree	SVM	RF	Markowitz	Winters	Leuven	G.NRC Beerenw.	Virco Margot	Virologic Rhee	MvP mEvar	
APV	susceptible	susceptible	1,4			1		0,2	0,6	1,7	
IDV	susceptible	susceptible	1,5		1	2	1	0,2	1,2	1,4	
LPV	susceptible	susceptible	1,2					0,4	1,3	5	
NFV	susceptible	susceptible	1,3	1	3	2	2	0,6	1,6	0,8	
RTV	susceptible	susceptible	1,3			1	2	0,8	0,8	1,5	
SQV	susceptible	susceptible	1,7		2	1	2	0,2	0,7	2,6	

RV2	2003	2003		
Genotyp	Phänotyp			
HIVdb classification	geno2pheno decision tree	SVM	RF	
APV	susceptible	susceptible	1,3	
IDV	susceptible	susceptible	1,9	
LPV	susceptible	susceptible		
NFV	susceptible	susceptible	1,8	
RTV	susceptible	susceptible	1,4	
SQV	susceptible	susceptible	2,3	

Abkürzungen:

Inhibitoren der HIV Protease

APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

HIVdb Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität <http://hivdb.stanford.edu>
 geno2pheno über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose <http://www.geno2pheno.org>
 decision tree Entscheidungsbaum-Klassifikation
 SVM Vektor-Maschinen-Klassifikation
 RF auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

Resistenzfaktoren nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
 mEvar+t multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
 mEvar multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
 s/mEtit einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
 sEvar herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen
 Referenzen Markowitz (Markowitz et al. 1998), Winters (Winters et al. 1998), German NRC (Beerenwinkel et al. 2002a), Virco (Margot et al. 2002), Virologic (Rhee et al. 2006)

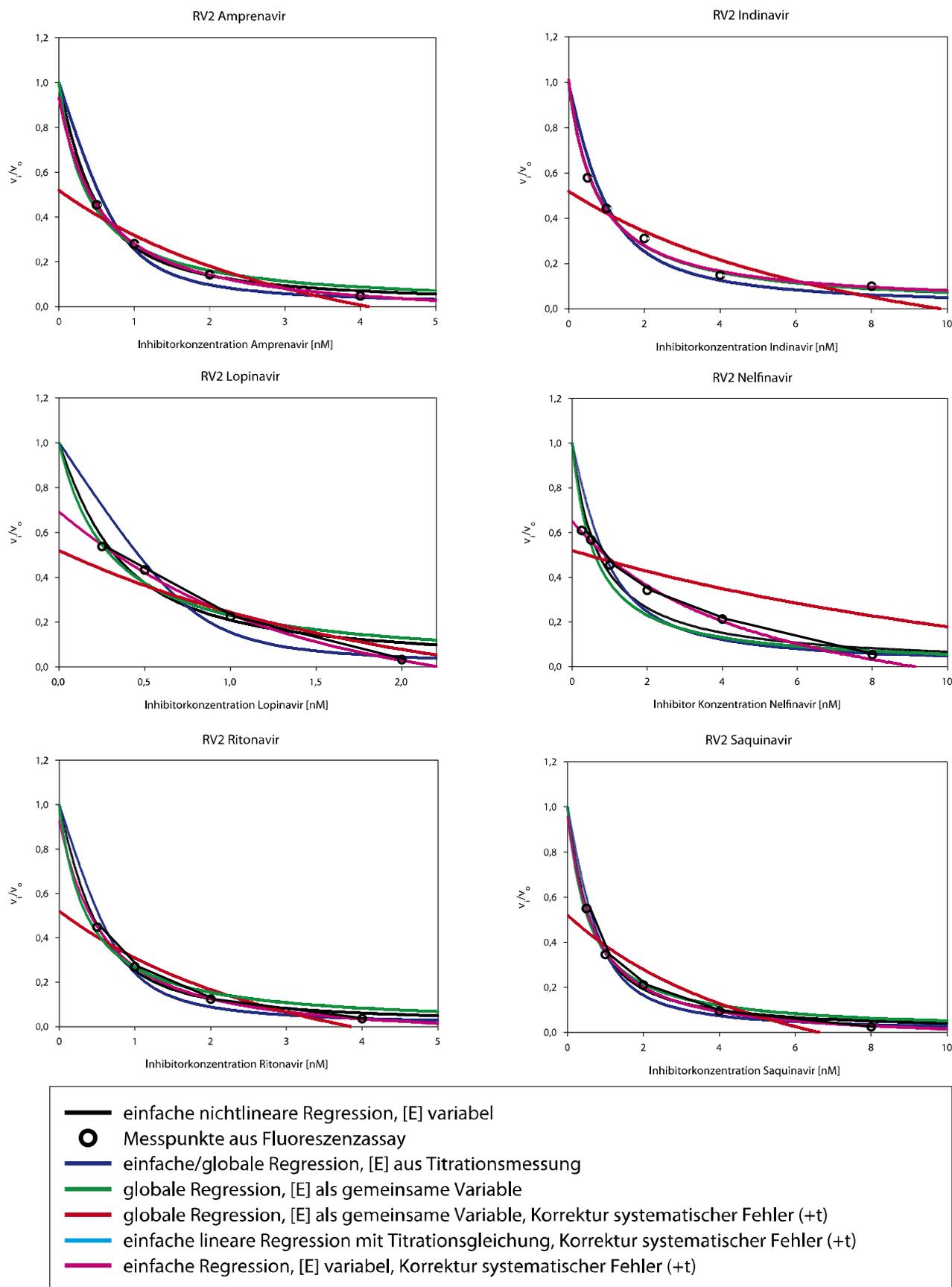
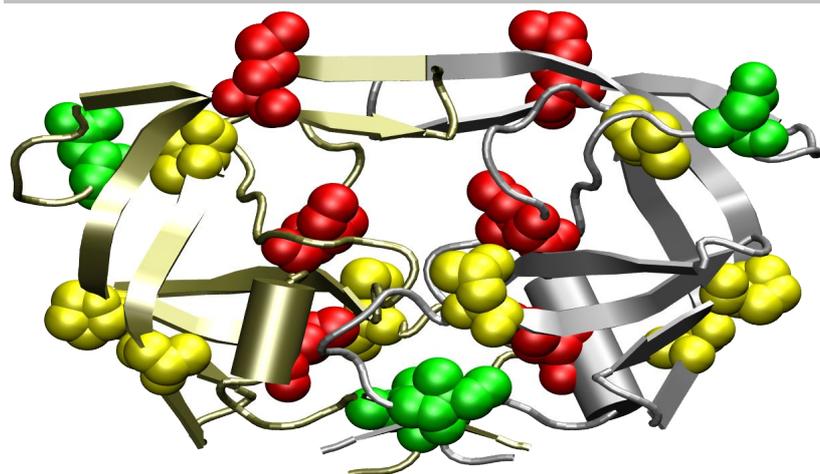
Abbildung 5.36: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV2

Abbildung 5.37: Resistenzfaktoren Protease RV3

**RV3***hochresistentes Resistenzprofil*

bedeutende Mutationen (rot):

M46I, I84V, L90M

geringfügige Mutationen (gelb):

L10I, L63P, A71V, V77I

andere Mutation (grün):

I3V, N37S

	2006		2006		2000		2001	2005	2006	2006
	Genotyp				Phänotyp					
	HIVdb	geno2pheno	SVM	RF	Virologic	Leuven	Virologic	Virologic	MvP	
	classification	decision tree			Petropoulos		Mo	Rhee		Evar+t
APV	high-level	resistant	resistant	9	4,5	2	5,5		16,5	
IDV	high-level	resistant	resistant	23,2	4,2	51	12	9,7	33	
LPV	intermediate	resistant	resistant	11,5			6,2	10	60,4	
NFV	high-level	resistant	resistant	24,7	11,5	46	35	16	90,5	
RTV	high-level	resistant	resistant	28,1	11,3	26	13	33	29,4	
SQV	high-level	resistant	resistant	41,6	4,9	42	26	10	62,5	

	2003		2003	
	Genotyp			
	HIVdb	geno2pheno	SVM	RF
	classification	decision tree		
APV	high-level	resistant	resistant	12,9
IDV	high-level	resistant	resistant	25,8
LPV	intermediate			
NFV	high-level	resistant	resistant	32,1
RTV	high-level	resistant	resistant	31,7
SQV	high-level	resistant	resistant	47,3

Abkürzungen:**Inhibitoren der HIV Protease**

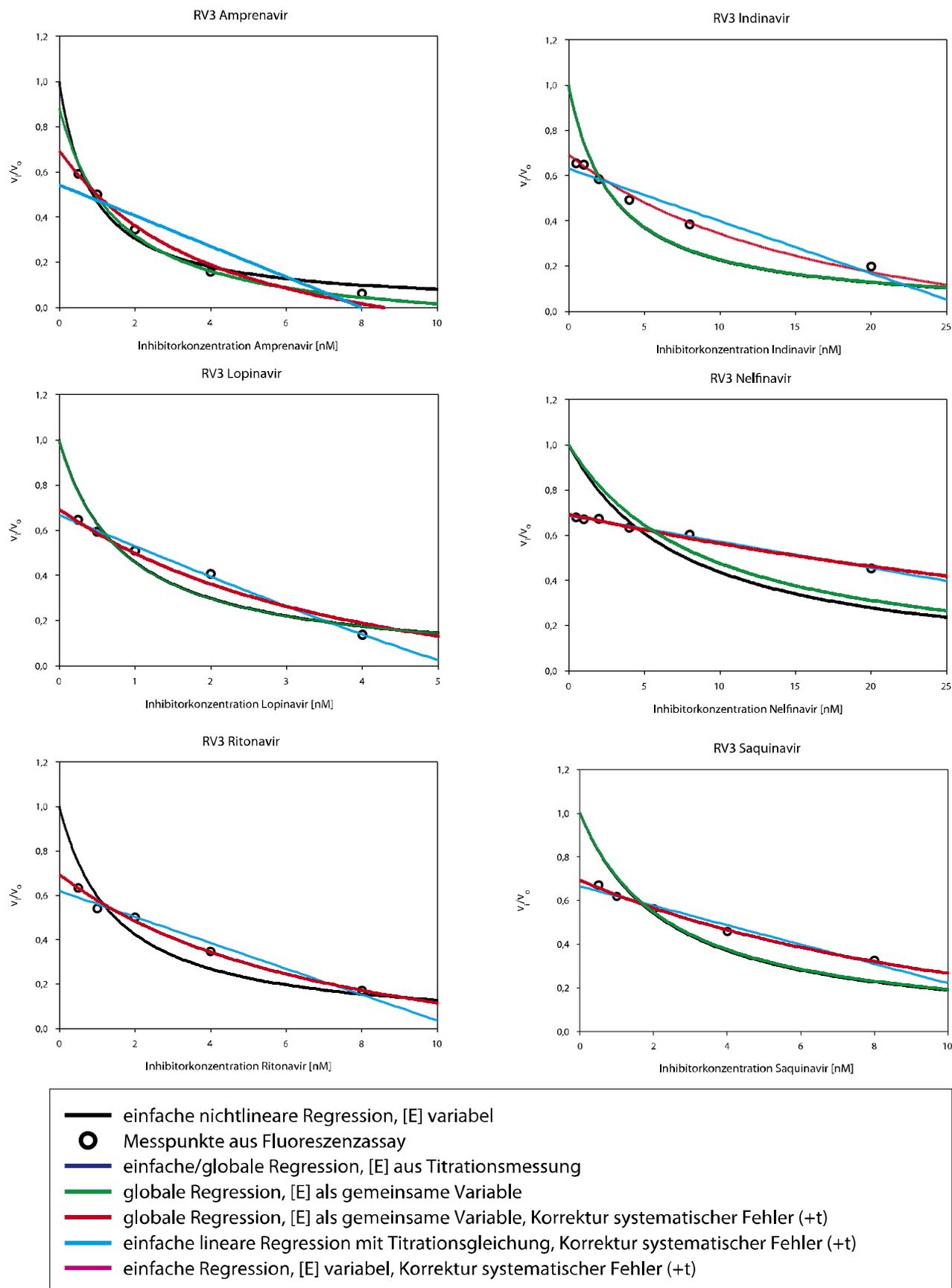
APV	Amprenavir	NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir	RTV	Ritonavir
LPV	Lopinavir	SQV	Saquinavir

Genotypische Resistenzprognose

HIVdb	Algorithmus zur genotypischen Interpretation der Stanford Universität http://hivdb.stanford.edu
geno2pheno	über Internet frei verfügbarer Algorithmus zur genotypischen Resistenzprognose http://www.geno2pheno.org
decision tree	Entscheidungsbaum-Klassifikation
SVM	Vektor-Maschinen-Klassifikation
RF	auf Basis eines SVM Regressions-Modells berechneter Resistenzfaktor

Phänotypische Resistenztestung

Resistenzfaktoren	nach unterschiedlichen Modellen der nichtlinearen Regressionsanalyse basierend auf Formel 4.4:
mEvar+t	multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable, Korrektur systematischer Fehler durch Summand t
mEvar	multiple Regression, Enzymkonzentration [E] als 2. Variable
s/mEtit	einfache bzw. multiple Regression mit Enzymkonzentration aus Titrationsmessung, K_i als einzige Variable
sEvar	herkömmliche einfache Regression mit Enzymkonzentration und Inhibitionskonstante als Variablen
Referenzen	Virologic 2000 (Petropoulos et al. 2000), Virologic 2005 (Mo et al. 2005), Virologic 2006 (Rhee et al. 2006)

Abbildung 5.38: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV3

6 DISKUSSION

6.1 VERGLEICH DER RECHENMODELLE

Die verschiedenen Modelle zur Berechnung der Inhibitionskonstanten aus den Messdaten des Fluoreszenzassays unterscheiden sich teilweise deutlich in den kalkulierten Resultaten. Die Differenzen werden hier in Bezug auf einzelne Größen diskutiert.

6.1.1 INHIBITIONSKONSTANTEN UND RESISTENZFAKTOREN

Betrachtet man die Gruppe der Proteasen aus der virologischen Routinediagnostik, scheinen zwischen den Graphen der verschiedenen Rechenmodelle lediglich geringfügige Unterschiede zu bestehen. Schon diese geringen Unterschiede resultieren jedoch in deutlich unterschiedlichen K_i -Werten und damit auch in deutlich anderen Resistenzfaktoren.

Viel deutlicher fallen die Unterschiede bei den Proteasen RV1-RV3 aus. Hier sind die Kurven schon alleine wegen der geringeren Anzahl an Messpunkten weniger exakt definiert, sodass der Interpretationsspielraum für die verschiedenen Modelle größer ist.

Insgesamt generiert das Modell mit multipler Regression und dem Versuch einer Korrektur systematischer Fehler via eines Summanden durchweg die plausibelsten Graphen.

6.1.1.1 TENDENZIELL HÖHERE RESISTENZFAKTOREN

Tendenziell ergeben sich bei der Berechnung mit multipler Regression höhere Resistenzfaktoren, als bei der herkömmlichen einfachen Regression. Protease 73 wurde bei Berechnung mit einfacher Regression als empfindlich gegenüber allen Inhibitoren klassifiziert. Die Berechnung mit multipler Regression sieht hingegen bei 4 der 6 untersuchten Inhibitoren Resistenzen – eine gute Übereinstimmung mit genotypischen Prognosen, die 2003 und 2006 ebenfalls 3-4 Inhibitoren als resistent einstufen.¹⁰⁰

Protease 174 gilt im Falle einfacher Regression bei 2 Inhibitoren, gemäß multipler Regression bei 5 Inhibitoren als resistent. Bei Protease 86 stehen 2 Resistenzen bei einfacher Regression 4 bei multipler Regression gegenüber.

Bei den am äußersten Rand des Spektrums stehenden Proteasen RV2 – sehr empfindlich – und RV3 – hochresistent – sind kaum signifikante Unterschiede zwischen den Rechenmodellen zu erkennen. Bei der intermediären Protease RV1 steigen zwar durch multiple Regression die kalkulierten Resistenzfaktoren ähnlich wie bei den Proteasen aus der Routinediagnostik, das führt jedoch nicht zu einer Diskordanz bei der Klassifikation.

Insgesamt scheint das Rechenmodell auf Basis multipler Regression den Blick für Resistenzen zu schärfen, also die Sensitivität zu erhöhen. Das wirft die kritische Frage auf, ob eine Überschätzung

¹⁰⁰Die hier diskutierten Klassifikationen nehmen einen *cutoff* von 3-facher Resistenz als Grenze zwischen empfindlich und resistent an.

der Resistenz vorliegen könnte. Dem sind jedoch die gute Übereinstimmung mit geno- und phänotypischen Prognosen entgegenzusetzen. Zudem ist im Sinne einer optimalen Therapieentscheidung für den Patienten eine hinsichtlich fraglicher Resistenzen evtl. überkritische Bewertung als günstiger zu bewerten, als eine zu vorsichtige.

Die Wahl des Rechenmodells erweist sich insbesondere bei intermediären Proteasen und ungünstiger Datenlage aus der enzymkinetischen Messung als kritisch – also gerade bei den Proteasen, die das interessanteste Klientel für den Assay bilden.

6.1.1.2 ÜBEREINSTIMMUNG MIT GENOTYPISCHER PROGNOSE

Die Übereinstimmung mit genotypischen Prognosen scheint sich mit dem neuen Rechenmodell zu erhöhen. Allerdings ist eine keineswegs unerhebliche Variabilität der genotypischen Prognosen aus dem Jahr 2003 im Vergleich zu denen aus dem Jahr 2006 zu konstatieren. Die zu Grunde liegenden Algorithmen bzw. phänotypischen Daten haben sich klar verändert. So findet sich zum Beispiel bei Protease 86 eine recht gute Übereinstimmung der phänotypischen Resultate mit der genotypischen Resistenzfaktoren-Prognose aus dem Jahr 2003: Protease 86 wurde bei einem cutoff von 3-facher Resistenz gegenüber dem Wildtyp bei 3 von 6 Inhibitoren als resistent eingestuft. Im Jahr 2006 hingegen wurde eine Empfindlichkeit gegenüber allen Inhibitoren berechnet.

Zudem gibt es auch Unterschiede zwischen den verschiedenen genotypischen Algorithmen.

6.1.2 ENZYMKONZENTRATION [E]

Die beste Anpassung an die Messpunkte wird augenscheinlich mit der individuellen Regressionsanalyse für jeden einzelnen Inhibitor und [E] als zweiter individueller Variable erreicht, denn hier existieren die meisten Freiheitsgrade. Dafür muss das fiktive Schwanken der Enzymkonzentration, also eine nicht realitätsgetreue und logisch inkonsistente Modellierung in Kauf genommen werden. Die Graphen werden sozusagen „um jeden Preis“ an die Messpunkte gefittet. Das bedeutet nicht nur theoretische Inkonsistenz, sondern verursacht über das fiktive Schwanken der Enzymkonzentration auch unsystematische Fehler in den berechneten Inhibitionskonstanten und Resistenzfaktoren.

Umgeht man dieses Problem, indem man die Enzymkonzentration einer Titrationsmessung zur Grundlage der Berechnung macht, erhält man von den Messpunkten abweichende Graphen. Die Zahl der bei der nicht linearen Regressionsanalyse zu ermittelnden Variablen reduziert sich auf eine Einzige: K_i . Dieses Verfahren war bisher die einzige Möglichkeit die Unstimmigkeiten des Rechenmodells hinsichtlich der Enzymkonzentration zu umgehen, konnte in der Praxis aber leider nicht als Standardmethode etabliert werden. Die Bestimmung der Enzymkonzentration in Titrationsmessungen ist aufwändig und erfordert erheblich Mengen aktiver Protease, die nicht bei allen Aufarbeitungen zur Verfügung steht.

Bei diesem Vorgehen werden die errechneten Inhibitionskonstanten und damit auch Resistenzfaktoren zudem erheblich von dem Ergebnis einer einzigen Messung beeinflusst – der Titration. Fehler bei der Bestimmung der Enzymkonzentration schlagen auf die Inhibitionskonstanten aller Inhibitoren durch.

Ein alternatives Verfahren war daher wünschenswert und wurde in Form eines neuen Rechenmodells basierend auf nicht linearer Regression entwickelt.

Belässt man $[E]$ als 2. Variable im Term, wird die Enzymkonzentration wie bei der einfachen Regression durch Berechnung bestimmt. Mit der Realität in Widerspruch stehende Schwankungen von $[E]$ sind jedoch ausgeschlossen, da $[E]$ als eine allen Gleichungen gemeinsame Variable definiert wird. Die hieraus resultierenden Graphen sind nahezu deckungsgleich mit denjenigen, die mit $[E]$ als - via Titrationsmessung ermittelter - Konstante berechnet wurden. Auch die K_i -Werte unterscheiden sich nur geringfügig.

Die aufwändigen und im Routineeinsatz wenig praktikablen Titrationsmessungen können so durch eine Berechnung mit dem weiterentwickelten Rechenmodell ersetzt werden.

6.1.3 PRINZIPIELLE ÄQUIVALENZ DER RECHENMODELLE

Anhand der Titrationsmessung lässt sich auch die prinzipielle Äquivalenz zwischen der Berechnung von K_i mittels multipler und einfacher Regression demonstrieren. Ersetzt man bei der globalen Regression die Variable $[E]$, wie eben beschrieben, durch den Wert aus der Titrationsmessung, erhält man nahezu identischen K_i -Werte und Graphen, wie bei einfacher Regression – allerdings in einem einzigen Ansatz, anstelle von 6 einzelnen Berechnungen.

Die bei qualitativ hochwertigen enzymkinetischen Messdaten bestehende Unabhängigkeit der Resultate zwischen Berechnung und Experiment sowie lediglich minimale Unterschiede zwischen den Rechenmodellen belegen die theoretische Gleichwertigkeit der verschiedenen Ansätze.

6.1.4 ROBUSTHEIT GEGENÜBER SCHWIERIG REGREDIERBAREN DATEN

Die geringen Schwankungen der unterschiedlichen Modelle bei den Proteasen 76, 83 und 174 sind als der Erfolg des veränderten Layouts der Mikrotiterplatten mit mehr und gezielter positionierten Messpunkten zu werten. Dank qualitativ hochwertiger Ausgangsdaten fällt das eingesetzte Rechenmodell weniger stark ins Gewicht.

Deutlichere Unterschiede zwischen den verschiedenen Rechenmodellen treten hingegen in der Gruppe der Protease aus der Universität Leuven RV1-3 zu Tage. Diese Proteasen wurden nach dem herkömmlichen Protokoll gemessen, das zu Gunsten von Doppelbestimmungen weniger Messpunkte vorsah. Systematische Fehler der Messwerte fallen hier stärker ins Gewicht. Die Rekonstruktion der Enzymkinetik aus teilweise nur 4 Punkten ist schwierig.

In dieser Situation treten die Unterschiede der Modelle klar hervor. Während das alte Modell erheblich von den Messpunkten abweichende, unrealistische Kurven prognostiziert, kommt das weiterentwickelte Modell auch mit diesen schwierigen Ausgangsbedingungen noch gut zurecht.

6.1.5 DATENAUSSCHÖPFUNG

Dadurch, dass alle Ansätze gleichzeitig berechnet werden, basiert die Regression nicht mehr isoliert auf den Daten einer Messreihe, sondern bezieht die Information der gesamten Mikrotiterplatte mit ein. Die Berechnung der Resistenzfaktoren und der Enzymkonzentration wird so auf eine breitere Datenbasis gestellt und ist weniger empfindlich gegenüber Ausreißern. Das Verhalten gegenüber einem Inhibitor wird als das betrachtet, was es ist: **ein** Teilaspekt **eines** Enzyms.

6.1.6 KORREKTUR SYSTEMATISCHER FEHLER

Das neue Modell ist in der Lage systematische Fehler - wenigstens teilweise - zu kompensieren. Diese Fähigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit durch einen Korrektur-Summanden, der eine Verschiebung der Messwerte ausgleicht, wie sie durch Fehlbestimmungen in v_0 erzeugt werden, demonstriert. Dieser Korrekturmechanismus wird erst durch multiple Regression möglich. Wird er zusammen mit einfacher Regression verwendet, entstehen neben den ohnehin schon vorhandenen fiktiven Schwankungen in der Enzymkonzentration zusätzliche unsystematische Schwankungen im Korrekturfaktor. Die Regressionsanalyse wird zur Willkür.

Multiple Regression korrigiert gezielt ausschließlich systematische Abweichungen, die in allen Wells der Mikrotiterplatte gleich ausgeprägt sind. Denn der korrigierende Term - hier der Summand - wird, wie die Enzymkonzentration, als allen Gleichungen gemeinsame Variable definiert.

Während im Rahmen dieser Arbeit zur Erprobung der Methode lediglich ein einfacher Korrektur-Summand integriert wurde, sind in Zukunft wesentlich komplexere und dafür präzisere Terme denkbar.

6.1.7 STANDARDISIERUNG

Das neue Modell ist in der Praxis wesentlich leichter anwendbar. Es muss nicht für jeden Inhibitor eine eigene Berechnung von Hand ausgeführt werden, sondern das Ergebnis wird in einem gemeinsamen Ansatz auf Knopfdruck gelöst. Dadurch wird eine weit gehende Automatisierung und Standardisierung, wie sie für den Einsatz in der Routinediagnostik elementar ist, möglich. Die Steuerungssoftware des Fluoreszenzreaders wurde so programmiert, dass sie eine zur direkten Auswertung im Statistikprogramm geeignete Tabelle ausgibt. Das Statistikprogramm wendet eine fest definierte Regressionsvorlage auf diese Tabelle an und gibt einen ausführlichen Report aus. Fehlbedienung ist auf diese Weise so gut wie ausgeschlossen.

6.2 VERGLEICH MIT ETABLIERTEN TESTSYSTEMEN

6.2.1 MESSBEREICH

Der Messbereich des enzymkinetischen Fluoreszenzassays ist deutlich umfangreicher, als der genotypischer Prognosen und zellkulturbasierter phänotypischer Assays.

Bei hochresistenten Proteasen wie RV3 wird auch noch ein Resistenzfaktor von 90 abgebildet. Allerdings hat dies wohl in der Routinediagnostik keine erheblichen Auswirkungen, da ein Inhibitor ab einem Resistenzfaktor von ca. 10-fach sicher nicht mehr für eine Therapie empfohlen werden kann.

Während HIV-Proteasen mit wenig Mutationen in Zellkulturassays häufig keine messbaren Resistenzen aufwiesen (Hertogs et al. 1998; Petropoulos et al. 2000), werden vom enzymkinetische Assay des MvP auch geringe Resistenzfaktoren zuverlässig erfasst. Die Beimengung von nur 5% hochresistenter Protease zu Wildtyp-Protease konnte reproduzierbar nachgewiesen werden (Hoffmann 2002).

Das Phänomen, dass enzymkinetische Assays höhere Resistenzfaktoren messen, als zellkultur-basierte Systeme wurde in der Literatur bereits mehrfach berichtet (Klabe et al. 1998; Maschera et al. 1995) und hat sich auch im Rahmen dieser Arbeit erneut bestätigt.

6.2.2 REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist, wie die wiederholten Aufarbeitungen von Wildtyp- und Patienten-Proteasen zeigen, denen etablierter Testsysteme ebenbürtig. Die Schwankungsbreite liegt in etwa bei einem maximalen Faktor von 3 (Heid 2006). Im Vergleich zu zellkultur-basierten Systemen ist der Assay wegen der deutlich geringeren Komplexität und höheren Spezifität sicherlich im Vorteil. Angesichts der vergleichsweise geringen Anzahl von Untersuchungen lässt sich das aktuell jedoch noch nicht mit statistisch verlässlichen Daten untermauern.

6.2.3 KOSTEN

Zu den wesentlichen Vorteilen gegenüber zellkultur-basierten Systemen zählen auch die deutlich geringeren Kosten. Etwa 700 bis 1000 US \$ stehen schätzungsweise ca. 450 US \$ gegenüber. Es bleibt zu hoffen, dass sich phänotypische Testungen dadurch im, von zunehmendem Kostendruck geprägten, klinischen Alltag leichter etablieren können und zukünftig häufiger angefordert werden. Nur so können die letztendlich auf phänotypische Daten angewiesenen genotypischen Prognose-systeme ihr Niveau auf lange Sicht halten und sich weiterentwickeln.

6.2.4 ZEITAUFWAND

Therapieentscheidungen müssen in der klinischen Praxis rasch gefällt werden. Der für eine phänotypische Testung vergleichsweise geringe Zeitaufwand von etwa 4 Tagen (gegenüber ca. 3 Wo-

chen bei zellkulturbasierten Assays) gehört deshalb sicher zu den gravierendsten Argumenten für das am Max von Pettenkofer-Institut entwickelte Testsystem. Neue Techniken zur Expression, wie in vitro Translationssysteme, können den Zeitaufwand weiter reduzieren.

6.2.5 VERGLEICH MIT GENOTYPISCHEN ERGEBNISSEN

Die genotypischen Ergebnisse stimmen in ihrer Grundtendenz gut mit den phänotypischen Daten des Fluoreszenzassays überein. Bei den intermediären Proteasen aus der virologischen Routinediagnostik driften bei einzelnen Inhibitoren die genotypischen Prognosen untereinander und die des Assays auseinander. Ein phänotypischer Resistenztest stellt hier also einen Zugewinn an Information dar. Im Gegensatz zu den genotypischen Prognosen handelt es sich bei den Resultaten des phänotypischen Assays immerhin um das Ergebnis einer präzisen Messung.

Glaut man den Ergebnissen des phänotypischen Assays, würde das in einigen Fällen zu veränderten Therapieentscheidungen führen. Ob die phänotypische Prognose der genotypischen letztere in der Praxis überlegen ist, ist seit Langem Gegenstand hitziger Diskussionen und lässt sich langfristig nur durch die Korrelation mit klinischen Daten eruieren.

Generell lässt sich beobachten, dass die nach dem neuen Rechenmodell berechneten Resistenzfaktoren eine bessere Übereinstimmung zu den Ergebnissen anderer Testsystem zeigen, als die des alten Modells.

6.2.6 VERGLEICH MIT PHÄNOTYPISCHEN ERGEBNISSEN

Die Ergebnisse der phänotypischen Assays stimmen sowohl untereinander, als auch mit den Ergebnissen des enzymkinetischen Assays in ihrer Grundtendenz gut überein. Signifikante Unterschiede traten erwartungsgemäß in erster Linie beim intermediären Resistenzprofil der Protease RV1 auf. Bei der Bewertung der sensitiven Protease RV2 sowie der hochresistenten Protease RV3 herrscht hingegen Einigkeit zwischen allen phänotypischen Assays.

Bei der Beurteilung von RV1 steht der enzymkinetische Assay, der die Protease im Gegensatz zu zwei anderen phänotypischen Assays und den genotypischen Prognosen gegenüber Indinavir und Nelfinavir noch als sensitiv einstuft, alleine da. Dabei sollte aber berücksichtigt werden, dass es sich bei den konkurrierenden phänotypischen Assays um zellkulturbasierte Systeme handelt, die naturgemäß den gesamten Replikationszyklus untersuchen, während sich der Assay des MvP auf die Inhibition der viralen Protease konzentriert. Es ist also denkbar, dass die Differenzen durch andere, von der reinen Inhibition unabhängige Effekte im Replikationszyklus bedingt sind. Dass genotypische Prognosen das Enzym ähnlich bewerten, ist insofern wenig erstaunlich, als sich ihre zu Grunde liegenden Algorithmen und Datenbanken vorwiegend aus den Resultaten zellkulturbasierter phänotypischer Assays speisen.

6.2.7 KONKURRENZFÄHIGKEIT

6.2.7.1 KONKURRENZFÄHIGKEIT ZU ZELLKULTURBASIERTEN ASSAYS

Um direkt mit zellkulturbasierten Assays konkurrieren zu können, wäre zur Prognose der Wirksamkeit einer zeitgemäßen HAART ergänzend mindestens noch ein vergleichbarer Assay der Reversen Transkriptase notwendig. Zukünftig müssten auch Fusionsinhibitoren und womöglich auch Inhibitoren der Integrase berücksichtigt werden.

Ein Testsystem für die Reverse Transkriptase wurde am Max von Pettenkofer-Institut zwar etabliert (Obermeier 2006), ist jedoch derzeit für den Einsatz in der Routinediagnostik nicht ausreichend robust. Während sich die genannten Wirkstoffe vergleichsweise einfach in zellkulturbasierte Systeme integrieren lassen dürften (z. B. Erweiterung der Genom-Kassette um das Integrase Gen des Patientenvirus), ist die Entwicklung spezifischer Assays, wie dem hier vorgestellten enzymkinetischen Assay der HIV-Protease, sehr aufwändig.

Zur wissenschaftlichen Analyse und Weiterentwicklung von Wirkstoffen werden spezifische enzymkinetische Testsysteme unverzichtbar bleiben. Bei klinischen Fragestellungen, bei denen es im Grunde eher darauf ankommt das Ausmaß der Replikationshemmung zu quantifizieren und der Mechanismus der Inhibition weniger im Mittelpunkt steht, scheinen zellkulturbasierte Assays zunächst geeigneter. Die pauschale Betrachtung des gesamten Replikationszyklus kann in diesem Fall als Vorteil gesehen werden. Enorme Kosten und lange Untersuchungszeiten relativieren diese Überlegenheit jedoch erheblich und lassen die behandelnden Ärzte – wenn überhaupt eine Resistenztestung durchgeführt wird – zumeist auf genotypische Prognosen zurückgreifen.

6.2.7.2 KONKURRENZFÄHIGKEIT ZU GENOTYPISCHEN PROGNOSEN

Genotypische Prognosen sind inzwischen zwar von erstaunlich guter Qualität, haben aber verfahrensbedingt mit zahlreichen Schwierigkeiten zu kämpfen. Wie auch zellkulturbasierte Assays berücksichtigen sie nur in geringem Maße Non-B-Subtypen bzw. Quasispezies. Subpopulationen werden erst ab einem Anteil von 10-40 % detektiert (Hanna & D'Aquila 2001; Petropoulos et al. 2000). Genotypische Prognosen haben ferner eine verhältnismäßig geringe Aussagekraft bei Beurteilung von Kreuzresistenzen und dem Verhalten der Protease gegenüber komplexen Therapieschemata. Letzteres ist angesichts der steigenden Zahl verfügbarer Präparate besonders kritisch. Darüber hinaus sollte nicht vergessen werden, dass jede genotypische Prognose auf Ergebnisse phänotypischer Testsysteme zurückgeht. Für neuartige bzw. sehr junge Medikamente sind daher keine verlässlichen genotypischen Prognosen möglich.

6.3 SINVOLLE EINSATZFELDER DER ASSAYS

Ein sinnvolles Einsatzfeld für den hier beschriebenen enzymkinetischen Assay in der klinischen Routinediagnostik sehen wir daher insbesondere in der Beurteilung von Proteasen mit unplausiblen genotypischen Prognosen und der Wirksamkeit junger Therapeutika.

Die Möglichkeit auch niedrige Resistenzprofile zu erfassen und Quasispecies mit geringem prozentualem Anteil an der Gesamtpopulation im Patienten abzubilden, prädestiniert den Assay für die Resistenzanalyse bei akuten HIV-Infektionen und Infektionen in der Schwangerschaft (Vermeidung einer vertikalen Übertragung durch gezielte Therapie). Da die Ergebnisse rasch verfügbar sind, ist er auch zur Anpassung einer Postexpositionsprophylaxe geeignet.

Diese Marktlücken werden durch das modulare Konzept des Assays, der auf vorhandene PCR-Produkte der genotypischen Analyse aufsetzt, begünstigt. Schon jetzt bietet der Assay gegenüber zellkulturbasierten Systemen klare Vorteile hinsichtlich Zeit und Kosten, die sich durch die Integration neuer Techniken wie in vitro Translationssystemen noch ausbauen lassen.

Mit dem am Max von Pettenkofer-Institut entwickelten enzymkinetischen Assay der HIV-Protease steht dem Kliniker nun ein weiteres hilfreiches Werkzeug zur Unterstützung seiner Therapieentscheidungen bei AIDS zur Verfügung.

7 ANHANG

7.1 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Eberle, der mir die Möglichkeit zu dieser Dissertation gegeben hat, großzügige Freiräume bei der Bearbeitung des Themas eingeräumt hat und mich stets mit konstruktiver Kritik unterstützt hat.

Ohne die gleich bleibend exzellente Betreuung durch Dr. Hans Nitschko, und dessen fachlichen und mentalen Beistand, wäre diese Arbeit sicher nicht gelungen. Ich bedanke mich bei ihm insbesondere für das erstklassige *Coaching* bei der täglichen Laborarbeit, spannende Diskussionen und sein immer offenes Ohr in allen Notlagen.

Bei Bart Maes von der Universität Leuven bedanke ich mich für die Überlassung der Proteasen RV1-3 mitsamt zugehörigen phänotypischen Testergebnissen sowie die fruchtbare Zusammenarbeit im Labor und die schöne gemeinsame Zeit in München.

Dieter Hoffmann hat mich in die Untiefen des maßgeblich von ihm entwickelten Fluoreszenz-Assays eingeweiht: Vielen Dank für die Beratung und das *Know How!*

Besonderer Dank gilt auch den technischen Assistentinnen der virologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Institutes – u. a. für unzählige hilfreiche Tipps und die gute Atmosphäre.

Herrn Professor von der Helm danke ich für die Überlassung seines hervorragend ausgestatteten Labors. Herr Prof. Koszinowski und Herr Prof. Heesemann ermöglichten mir den praktischen Teil dieser Dissertation im Rahmen des Graduiertenkolleges „Infektion und Immunität“ zu absolvieren.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Barbara und Wilfried Müller-Sarnowski sowie meiner Frau Ann-Luise Kirsten für Ihre Unterstützung, Geduld und Nachsicht während langer Wochenenden im Labor und vor dem Computer meinen innigsten Dank aussprechen.

7.2 OPEN SOURCE

Wie viele andere wissenschaftliche Publikationen, wäre diese Arbeit ohne die Open Source Bewegung nicht möglich gewesen. Die Dissertation wurde mit *OpenOffice* und den Bibliographiedatenbanken *Bibus* (mit MySQL) und *JabRef* geschrieben. Zur Datenanalyse wurden u. a. EMBOSS das *Staden Package* und die freie Statistiksprache R verwendet. Bei den Illustrationen halfen die Ray-tracer *POV-Ray* und *Tachyon*. Diverse weitere Werkzeuge wurden im Text referenziert.

Ich möchte mich daher herzlich bei allen Entwicklern und Mitarbeitern der Projekte für ihr Engagement und ihren großzügigen Wissenstransfer bedanken.

Gleichzeitig will dieser Hinweis auf die wichtigsten verwendeten Open Source Programme dazu ermuntern, quelloffene und somit nachvollziehbare, anpassungsfähige und zukunftssichere Software bzw. Dateiformate für wissenschaftliche Aufgaben zu nutzen.

7.3 ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME

A

ANRS

Agence Nationale de Recherche sur le SIDA

B

BIV

Bovine Immunodeficiency Virus (engl. bovine = deut. rinderartig)

C

CA

core antigen

CADD

computergestützte Wirkstoffentwicklung (engl. computer aided drug design)

CAS

Chemical Abstract Service, American Chemical Society

CDC

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

cDNA

komplementäre DNA (engl. complementary DNA)

CDx

Cluster of Differentiation; Klassifikationssystem anhand von Oberflächenmarkern

E

env

Hülle (engl. envelope); HIV Gen

[E]

Enzymkonzentration

F

F.U.

Fluoreszenzeinheit (engl. fluorescent unit)

FIV

Feline Immunodeficiency-Virus (engl. feline = deut. katzenartig)

G

gag

Gruppen Antigen (engl. group antigen); HIV Gen

gpX

Glykoproteine des HI-Virus werden mit gp gefolgt von ihrem Gewicht in Kilo Dalton bezeichnet

GRADE

Genotypischer Resistenz Algorithmus Deutschland

H

HAAT

hochwirksame antiretrovirale Therapie (engl. highly active antiretroviral therapy)

HCV

7. ANHANG

Hepatitis C Virus

HIV

Human Immunodeficiency Virus

HIVdb

HiV Drug Resistance Database

HPLC

High Performance Liquid Chromatography

I

ICTV

International Committee on Taxonomy of Viruses

ICTVdb

Taxonomiedatenbank des ICTV

IN

Integrase

[I]

Inhibitorkonzentration

K

Ki

Inhibitionskonstante; Einheit nM

Km

Michaelis-Menten-Konstante; Einheit nM

Komb.

Kombination

L

LTR

long terminal repeats

M

MA

Matrixprotein

MHC

Major Histocompatibility Complex; Makromolekül zu Präsentation von Antigenen an Zelloberflächen

MvP

Max von Pettenkofer-Institut

MW

Molekulargewicht (engl. molecular weight) in Dalton

N

NC

Nukleoprotein

NCBI

National Center for Biotechnology Information der USA

NLM

National Library of Medicine, USA

NNRTI

nicht nukleosidische Inhibitoren der RT

NRTI

nukleosidische Inhibitoren der RT

O**ORF**

offenes Leseraster (engl. open reading frame)

P**PBMC**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)

PCR

Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)

PDB

Protein Data Bank

PEP

Postexpositionsprophylaxe

PHIL

Public Health Image Library (PHIL), CDC

pol

Polymerase (engl. polymerase); HIV Gen

PR

Protease

pX

Proteine des HI-Virus werden mit p gefolgt von ihrem Gewicht in Kilo Dalton bezeichnet

R**RKI**

Robert Koch Institut, Berlin

RNA

Ribonukleinsäure (engl. ribo nucleic acid)

RT

Reverse Transkriptase

RTS

Rapid Translation System™; in vitro Translationssystem der Firma Roche

S**SD**

Standardabweichung (engl. standard deviation)

SIS

Specialized Information Services, NLM

SIV

Simian Immunodeficiency Virus (engl. simian = deut. affenartig)

T**TF**

Transframe Peptide

U

UNAIDS

Koordinierungsprogramm der Vereinten Nationen zur Bekämpfung von AIDS

V

vi

Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Anwesenheit von Inhibitori

vo

Geschwindigkeit des Substratumsatzes in Abwesenheit von Inhibitor

7.3.1 CODE DER AMINOSÄUREN

1-Buchstaben-Code	3-Buchstaben Code	Trivialname
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.3.2 INHIBITOREN DER HIV-PROTEASE

3-Buchstaben Code	Wirkstoff
APV	Amprenavir
NFV	Nelfinavir
IDV	Indinavir
LPV	Lopinavir
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir

7.4 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Kaposi Sarkom makroskopisch und histologisch.....	6
Abbildung 2.2: Pneumocystis carinii.....	6
Abbildung 2.3: AIDS Epidemiologie.....	7
Abbildung 2.4: Entwicklung der HIV-Prävalenz.....	7
Abbildung 2.5: Struktur des HI-Virus.....	9
Abbildung 2.6: Genom-Struktur-Beziehung der Lentiviridae am Beispiel HIV.....	11
Abbildung 2.7: Mechanismus nukleosidischer Inhibitoren der Reversen Transkriptase.....	12
Abbildung 2.8: Mechanismus nicht nukleosidischer Inhibitoren der Reversen Transkriptase.....	13
Abbildung 2.9: HIV Replikationszyklus.....	14
Abbildung 2.10: Inhibition der HIV-Protease.....	15
Abbildung 2.11: Bekannte natürliche Schnittstellen der HIV-Protease.....	16
Abbildung 2.12: Raumstruktur der HIV-Protease.....	17
Abbildung 2.13: Prinzip der hydrolytischen Spaltung der HIV PR.....	17
Abbildung 2.14: Struktur der HIV-Protease.....	18
Abbildung 2.15: Peptidomimetische Proteaseinhibitoren.....	19
Abbildung 2.16: Systematische struktur-basierte Entwicklung von Inhibitoren: Tipranavir.....	20
Abbildung 2.17: AIDS Epidemiologie in den USA 1985-2004.....	21
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Plasmids pBD2.....	37
Abbildung 4.1: Überblick der am MvP etablierten Assays zur Resistenztestung der HIV PR.....	39
Abbildung 4.2: C-terminaler antisense Primer P4M.....	42
Abbildung 4.3: Aufreinigung des PCR-Produktes über ein Agarosegel.....	44
Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum.....	45
Abbildung 4.5: Überprüfung der Restriktion.....	46
Abbildung 4.6: Kontrollplatten nach erfolgreicher Transformation.....	49
Abbildung 4.7: Ultraschallbehandlung von inclusion bodies.....	50
Abbildung 4.8: HCl-Titration.....	50
Abbildung 4.9: Das künstliche Substrat der HIV-Protease.....	52
Abbildung 4.10: Fluoreszenz-Lesegerät FL600.....	53
Abbildung 4.11: Berechnung des Stoffumsatzes mittels linearer Regressionsanalyse.....	54
Abbildung 4.12: Kinetische Graphen einer Mikrotiterplatte.....	54
Abbildung 4.13: Layout Mikrotiterplatten.....	55

Abbildung 4.14: EDANS Eichgeraden.....	56
Abbildung 4.15: Die Inhibitionskonstante K_i besteht aus k_{ass} und k_{diss}	59
Abbildung 4.16: Überblick über das Rechenmodell.....	63
Abbildung 4.17: Beispiel einer nichtlinearen Regressionsanalyse.....	64
Abbildung 4.18: Beispielgraph nichtlineare Regression.....	66
Abbildung 5.1: Wildtyp- K_i in verschiedenen Messungen: geringe Variationsbreite.....	70
Abbildung 5.2: Wildtyp- K_i in verschiedenen Messungen: Mittlere Variationsbreite.....	71
Abbildung 5.3: Wildtyp- K_i in verschiedenen Messungen: Hohe Variationsbreite.....	72
Abbildung 5.4: Vorschlag einer Klassifikation für phänotypische Resistenzassays.....	74
Abbildung 5.5: Verhalten des Rechenmodells bei Änderungen in $[E]$ und konstantem K_i	75
Abbildung 5.6: Verhalten des Rechenmodells bei Änderungen in K_i und konstantem $[E]$	77
Abbildung 5.7: deep well plate.....	81
Abbildung 5.8: Mehrfachbestimmung des Substratumsatzes ohne Inhibitor.....	82
Abbildung 5.9: Korrektur systematischer Fehler in v_0	83
Abbildung 5.10: Beispielgraph v_i , erstes Well der Messreihe.....	84
Abbildung 5.11: Beispielgraph v_i , letztes Well der Messreihe.....	85
Abbildung 5.12: Systematische Fehler in v_i	87
Abbildung 5.13: Beispiel eines stark ausgeprägten systematischen Messfehlers.....	88
Abbildung 5.14: Prüfung der Plausibilität der Messdaten.....	90
Abbildung 5.15: Ausschnitt Ergebnisprotokoll SigmaPlot.....	90
Abbildung 5.16: Die Cooksche Distanz: Beispielgraphen.....	91
Abbildung 5.17: Graph mit geringen Cookschen Distanz.....	92
Abbildung 5.18: Graph mit erheblichen Cookschen Distanzen.....	93
Abbildung 5.19: Verändertes Layout der Mikrotiterplatten.....	94
Abbildung 5.20: Größere Validität der Regressionsanalyse durch mehr Messpunkte.....	95
Abbildung 5.21: Fiktive Streuung der Enzymkonzentration.....	96
Abbildung 5.22: Separate Regression.....	97
Abbildung 5.23: Gleichzeitige, multiple Regression für alle Inhibitoren.....	98
Abbildung 5.24: Übereinstimmung zwischen Titrationsmessungen und neuem Rechenmodell.....	99
Abbildung 5.25: Auswirkung systematischer Fehler in v	100
Abbildung 5.26: Effekt des Korrektursummanden auf die Regressionsanalyse.....	100
Abbildung 5.27: Resistenzfaktoren Protease 73.....	102

Abbildung 5.28: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 73.....	103
Abbildung 5.29: Resistenzfaktoren Protease 86.....	104
Abbildung 5.30: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 86.....	105
Abbildung 5.31: Resistenzfaktoren Protease 174.....	106
Abbildung 5.32: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease 174.....	107
Abbildung 5.33: Berechnung von Resistenzfaktoren mit verschiedenen Modellen: RV1.....	108
Abbildung 5.34: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV1.....	109
Abbildung 5.35: Resistenzfaktoren Protease RV2.....	110
Abbildung 5.36: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV2.....	111
Abbildung 5.37: Resistenzfaktoren Protease RV3.....	112
Abbildung 5.38: Berechnung von K_i mit verschiedenen Modellen: Protease RV3.....	113

7.5 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Übersicht über die bekannten Proteine des HI-Virus.....	10
Tabelle 2.2: Bekannte natürliche Schnittstellen der HIV-Protease.....	16
Tabelle 2.3: Proteaseinhibitoren.....	20
Tabelle 2.4: Mutationen der HIV-Protease.....	22
Tabelle 2.5: Indikationen einer Resistenztestung.....	24
Tabelle 3.1: Geräte.....	30
Tabelle 3.2: Software.....	31
Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 3.4: Ausgewählte Chemikalien.....	32
Tabelle 3.5: Lösungen und Puffer.....	32
Tabelle 3.6: Medien.....	33
Tabelle 3.7: Enzyme.....	34
Tabelle 3.8: Künstliche Substrate der HIV-Protease.....	34
Tabelle 3.9: Peptidomimetische Proteaseinhibitoren.....	35
Tabelle 3.10: Oligonukleotide und DNA-Fragmente.....	35
Tabelle 3.11: HIV-1 Wildtypen.....	36
Tabelle 3.12: Proteasesequenzen aus der Routinediagnostik des MvP.....	36
Tabelle 3.13: Phänotypisch getestete Proteasen.....	36
Tabelle 3.14: Vektor.....	37
Tabelle 3.15: Elektrokompente Zellen.....	37
Tabelle 3.16: Experimentiersätze.....	37
Tabelle 4.1: Reverse Transkription, Mix.....	40
Tabelle 4.2: Reverse Transkription, Elongationsprogramm.....	40
Tabelle 4.3: Reaktionsansatz der long template PCR.....	41
Tabelle 4.4: PCR Programm long Template PCR.....	41
Tabelle 4.5: 2. PCR.....	42
Tabelle 4.6: Thermocycler Programm 2. PCR.....	43
Tabelle 4.7: Restriktion.....	45
Tabelle 4.8: Ligation.....	46
Tabelle 4.9: 2. PCR.....	47
Tabelle 4.10: PCR-Programm Sequenzierung.....	47

Tabelle 4.11: Steigung der EDANS-Eichgerade.....	56
Tabelle 4.12: K_i und K_m im Vergleich.....	60
Tabelle 4.13: Klassifikation reversibler Enzyminhibitoren nach Morrison.....	61
Tabelle 5.1: K_i -Werte WT-Protease in unterschiedlichen Aufarbeitungen und Testsystemen.....	73
Tabelle 5.2: Vorläufige Referenz Inhibitionskonstanten des Wildtyps.....	74
Tabelle 5.3: Der Quotient $[E]/K_i$ als Kontrolle der Messbedingungen.....	79
Tabelle 5.4: Die Geschwindigkeit des Stoffumsatzes in einer Messreihe.....	86
Tabelle 5.5: Entwicklung von R und R2 in einer Messreihe.....	86
Tabelle 5.6: Cooksche Distanzen, Auszug aus dem Messprotokoll.....	91

7.6 FORMELVERZEICHNIS

Formel 4.1: Die Inhibitionskonstante K_i	59
Formel 4.2: Scheinbare Inhibitionskonstante $K_i(\text{app})$	60
Formel 4.3: Kinetik festbindender reversibler Inhibitoren.....	61
Formel 4.4: Allgemeine Gleichung für kompetitive, reversible, festbindende Inhibitoren.....	62
Formel 4.5: Kinetik festbindender Inhibitoren unter Titrationsbedingungen.....	62
Formel 4.6: Kinetik klassischer Inhibitoren.....	62
Formel 5.1: Der Quotient $[E]/K_i(\text{app})$	78

7.7 EXKURSVERZEICHNIS

Exkurs 1: Grenzwerte phänotypischer Assays.....	29
Exkurs 2: Inhibitorclassen in Stichpunkten.....	57
Exkurs 3: Tubocuranin als prominentes Beispiel eines kompetitiven Hemmstoffes.....	58

7.8 LITERATURVERZEICHNIS

Die Abkürzungen von Fachzeitschriften entsprechen der PubMed-Nomenklatur. Die zugehörigen vollen Namen sind u. a. über den so genannten *Journalbrowser* des Entrez-Datenbankverbundes unter www.pubmed.gov einsehbar.

AIKEN, C.; KONNER, J.; LANDAU, N. R. ET AL. (1994) *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*, Cell, **76**(5): 853-64.

ANONYMOUS (1982) *Gay cancer focus of hearing*, The Washington Blade

ANONYMOUS (Abrufjahr 2006), *HIV & AIDS - History pictures & posters*, <http://www.avert.org/historyi.htm>

ANONYMOUS (NIH) (Abrufjahr 2001), *In Their Own Words... NIH researchers recall the early years of AIDS*, <http://aidshistory.nih.gov/>

ANONYMOUS (RKI) (Abrufjahr 2006), *Homepage Projektgruppe P 11 HIV-Variabilität und molekulare Epidemiologie des Robert Koch Institutes*, <http://www.rki.de/>

BAGOSSI, P.; SPERKA, T.; FEHER, A. ET AL. (2005) *Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites*, J Virol, **79**(7):4213-8.

BARRE-SINOSSI, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F. ET AL. (1983) *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*, Science, **220**(4599): 868-71.

BAUM, E. Z.; BEBERNITZ, G. A. & GLUZMAN, Y. (1990) *Isolation of mutants of human immunodeficiency virus protease based on the toxicity of the enzyme in Escherichia coli*, Proc Natl Acad Sci U S A, **87**(14):5573-7.

BAXTER, J. D.; MAYERS, D. L.; WENTWORTH, D. N. ET AL. (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 Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS*, Aids, **14**(9):F83-93.

BAXTER, J. D.; SCHAPIRO, J. M.; BOUCHER, C. A. B. ET AL. (2006) *Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Associated with Reduced Susceptibility and Virologic Response to the Protease Inhibitor Tipranavir.*, J Virol, **80**(21):10794-801.

BECK, Z. Q.; MORRIS, G. M. & ELDER, J.H. (2002) *Defining HIV-1 protease substrate selectivity*, Curr Drug Targets Infect Disord, **2**(1):37-50.

BEERENWINKEL, N. (2003) *Computational Analysis of HIV Drug Resistance Data*, Dissertation an der Universität des Saarlandes, **Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät I**, Saarbrücken.

BEERENWINKEL, N.; DAUMER, M.; OETTE, M. ET AL. (2003a) *Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes*, Nucleic Acids Res, **31**(13):3850-5.

BEERENWINKEL, N.; DÄUMER, M.; SIERRA, S. ET AL. (2002b) *Geno2pheno is predictive of short-term virological response.*, Antiviral Therapy, **7**(Suppl. 1):98.

BEERENWINKEL, N.; LENGAUER, T.; DAUMER, M. ET AL. (2003b) *Methods for optimizing antiviral combination therapies*, Bioinformatics, **19**(Suppl. 1):i16-25.

BEERENWINKEL, N.; SCHMIDT, B.; WALTER, H. ET AL. (2002c) *Quantitative phenotype prediction by support vector machines.*, Antiviral Therapy, **7**(Suppl. 1):97.

- BERKHOUT, B. (1999) *HIV-1 evolution under pressure of protease inhibitors: climbing the stairs of viral fitness*, J Biomed Sci, **6**(5):298-305.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z. ET AL. (2000) *The Protein Data Bank*, Nucleic Acids Res, **28**(1):235-42.
- BIETH, J. G. (1995) *Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics*, Methods Enzymol, **248**:59-84.
- BILLICH, A. & WINKLER, G. (1990) *Colorimetric assay of HIV-1 proteinase suitable for high-capacity screening*, Pept Res, **3**(6):274-6.
- BILLICH, S.; KNOOP, M. T.; HANSEN, J. ET AL. (1988) *Synthetic peptides as substrates and inhibitors of human immune deficiency virus-1 protease*, J Biol Chem, **263**(34):17905-8.
- BRENNAN, R. O. & DURACK, D.T. (1981) *Gay compromise syndrome*, Lancet, **2**(8259):1338-9.
- BRIGGS, J. A. G.; WILK, T.; WELKER, R. ET AL. (2003) *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*, EMBO J, **22**(7):1707-15.
- BRIZ, V.; POVEDA, E. & SORIANO, V. (2006) *HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways*, J Antimicrob Chemother, **57**(4):619-27.
- BRÖKER, M. (1986) *Vectors for regulated high-level expression of proteins fused to truncated forms of Echerichia coli β -Galactosidase*, Gene Anal Techn, **3**:53--57.
- BRUGHA, R. (2003) *Antiretroviral treatment in developing countries: the peril of neglecting private providers*, BMJ, **326**(7403):1382-4.
- CDC (1981) *Pneumocystis pneumonia--Los Angeles*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **30**(21):250-2.
- CDC (1982a) *Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **31**(37):507-8, 513-4.
- CDC (1982b) *A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **31**(23):305-7.
- CDC (1982c) *Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons--United States*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **31**(22):294, 300-1.
- CDC (1982d) *Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A*, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **31**(27):365-7.
- CHEARSKUL, P.; RONGKAVILIT, C.; AL-TATARI, H. ET AL. (2006) *New antiretroviral drugs in clinical use*, Indian J Pediatr, **73**(4):335-41.
- CHIU, H.; WANG, F.; CHEN, Y. A. ET AL. (2006) *Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing.*, J Gen Virol, **87**(Pt 7):2041-6.
- CLAVEL, F.; GUETARD, D.; BRUN-VEZINET, F. ET AL. (1986) *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*, Science, **233**(4761):343-6.
- COFFIN, J. M. (1995) *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*, Science, **267**(5197):483-9.
- COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A. ET AL. (1986) *What to call the AIDS virus?*, Nature, **321**(6065):10.
- COHEN, C. J.; HUNT, S.; SENSION, M. ET AL. (2002) *A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy*, Aids, **16**(4):579-88.

- COLLINS, K. L.; CHEN, B. K.; KALAMS, S. A. ET AL. (1998) *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*, Nature, **391**(6665):397-401.
- DAS, S. R. & JAMEEL, S. (2005) *Biology of the HIV Nef protein*, Indian J Med Res, **121**(4):315-32.
- DASH, C.; KULKARNI, A.; DUNN, B. ET AL. (2003) *Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development*, Crit Rev Biochem Mol Biol, **38**(2):89-119.
- DAVIES, D. R. (1990) *The structure and function of the aspartic proteinases*, Annu Rev Biophys Chem, **19**:189-215.
- DAYTON, A. I.; SODROSKI, J. G.; ROSEN, C. A. ET AL. (1986) *The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication*, Cell, **44**(6):941-7.
- DE CLERCQ, E. (2004) *HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches*, Int J Biochem Cell Biol, **36**(9):1800-22.
- DE LUCA, A.; CINGOLANI, A.; DI GIAMBENEDETTO, S. ET AL. (2003) *Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance*, J Infect Dis, **187**(12):1934-43.
- DE OLIVEIRA, T.; ENGELBRECHT, S.; JANSE VAN RENSBURG, E. ET AL. (2003) *Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness?*, J Virol, **77**(17):9422-30.
- DEMETER, L. & HAUBRICH, R. (2001) *International perspectives on antiretroviral resistance. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability, and interpretations*, J Acquir Immune Defic Syndr, **26**(Suppl 1):3-9.
- DOMINGO, E.; MENENDEZ-ARIAS, L.; QUINONES-MATEU, M. E. ET AL. (1997) *Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants*, Prog Drug Res, **48**:99-128.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F. & RAGSDALE, C.W. (1988) *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*, Nucleic Acids Res, **16**(13):6127-45.
- DROSOPOULOS, W. C.; REZENDE, L. F.; WAINBERG, M. A. ET AL. (1998) *Virtues of being faithful: can we limit the genetic variation in human immunodeficiency virus?*, J Mol Med, **76**(9):604-12.
- DUNN, B. M.; GOODENOW, M. M.; GUSTCHINA, A. ET AL. (2002) *Retroviral proteases*, Genome Biol, **3**(4):REVIEWS3006.
- DUNN, D. T.; GIBB, D. M.; BABIKER, A. G. ET AL. (2004) *HIV drug resistance testing: is the evidence really there?*, Antivir Ther, **9**(5):641-8.
- DURANT, J.; CLEVENBERGH, P.; HALFON, P. ET AL. (1999) *Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial*, Lancet, **353**(9171):2195-9.
- EBERLE, J. (2006). *Virologische Grundlagen der Wirkung von Proteaseinhibitoren*. In BOGNER, J. R. (Ed.), *Proteasehemmer in der HIV-Therapie* (Edition), **unimed**, Bremen.
- EBERLE, J.; BECHOWSKY, B.; ROSE, D. ET AL. (1995) *Resistance of HIV type 1 to proteinase inhibitor Ro 31-8959*, AIDS Res Hum Retroviruses, **11**(6):671-6.
- EUROGUIDELINES GROUP FOR HIV RESISTANCE (2001) *Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. The EuroGUidelines Group for HIV resistance*, AIDS, **15**(3): 309-20.
- FINZI, D.; HERMANKOVA, M.; PIERSON, T. ET AL. (1997) *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*, Science, **278**(5341):1295-300.

- FIorentINI, S.; MARINI, E.; CARACCIOLo, S. ET AL. (2006) *Functions of the HIV-1 matrix protein p17*, New Microbiol, **29**(1):1-10.
- FISHER, A. G.; FEINBERG, M. B.; JOSEPHS, S. F. ET AL. (1986) *The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication*, Nature, **320**(6060):367-71.
- FLEXNER, C. (2000) *HIV genotype and phenotype--arresting resistance?*, JAMA, **283**(18):2442-4.
- FONTAINE, E.; RIVA, C.; PEETERS, M. ET AL. (2001) *Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J*, J Acquir Immune Defic Syndr, **28**(3):254-8.
- FRANCA, R.; SPADARI, S. & MAGA, G. (2006) *APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism.*, Med Sci Monit, **12**(5):RA92-8.
- FREED, E. O. (2001) *HIV-1 replication*, Somat Cell Mol Genet, **26**(1-6):13-33.
- FREED, E. O. & MARTIN, M.A. (2001). *HIVs and their replication*. In KNIPE, D.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; ROIZMAN, B.; MARTIN, M. & STRAUS, S. (EDS.), Fields Virology (4th Edition), **Lippincott, Williams and Wilkins**, Philadelphia.
- GARCIA LERMA, J.; SCHINAZI, R. F.; JUODAWLKIS, A. S. ET AL. (1999) *A rapid non-culture-based assay for clinical monitoring of phenotypic resistance of human immunodeficiency virus type 1 to lamivudine (3TC)*, Antimicrob Agents Chemother, **43**(2):264-70.
- GEHRINGER, H. (2001) *Etablierung und Evaluierung eines neuartigen phänotypischen Testsystems zur Bestimmung der Resistenz gegen HIV-1-Protease-Inhibitoren*, Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, Lehrstuhl für Virologie des Max von Pettenkofer-Institutes, München.
- GEHRINGER, H.; VON DER HELM, K.; SEELMEIR, S. ET AL. (2003) *Development and evaluation of a phenotypic assay monitoring resistance formation to protease inhibitors in HIV-1-infected patients*, J Virol Methods, **109**(2):143-52.
- GELDERBLOM, H. R. (1991) *Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function*, AIDS, **5**(6):617-37.
- GELDERBLOM, H. R. (1997). *Fine Structure of HIV and SIV*. In KORBER, B.; FOLEY, B.; LEITNER, T. & McCUTCHAN, F. (EDS.), Human Retroviruses and AIDS 1997 (1997 Edition), **Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory**, .
- GIRI, M.; UGEN, K. E. & WEINER, D.B. (2004) *DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade*, Clin Microbiol Rev, **17**(2):370-89.
- GOTTLIEB, M. S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H. M. ET AL. (1981) *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*, N Engl J Med, **305**(24):1425-31.
- GOTTLINGER, H. G. (2001) *The HIV-1 assembly machine*, AIDS, **15**(Suppl 5):S13-20.
- GROSS, M.; FURTER, R. & WALLIMANN, T. (1995) *Einsatz von Benzonase zur effektiven Reinigung von inclusion bodies aus E. coli*, Merck Biochem Service, **4**:1-3.
- GUEX, N. & PEITSCH, M.C. (1997) *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*, Electrophoresis, **18**(15):2714-23.
- GULICK, R. M.; MELLORS, J. W.; HAVLIR, D. ET AL. (2000) *3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine*, Ann Intern Med, **133**(1):35-9.
- GUNTARD, H. F.; WONG, J. K.; IGNACIO, C. C. ET AL. (1998a) *Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples*, AIDS Res Hum Retroviruses, **14**(10):869-76.

- GUNTARD, H. F.; WONG, J. K.; IGNACIO, C. C. ET AL. (1998b) *Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy*, J Virol, **72**(3):2422-8.
- GÜRTLER, L. G.; HAUSER, P. H.; EBERLE, J. ET AL. (1994) *A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.*, J Virol, **68**(3):1581-5.
- HANNA, G. J. & D'AQUILA, R.T. (2001) *Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy*, Clin Infect Dis, **32**(5):774-82.
- HARRIGAN, P. R.; MONTANER, J. S.; WEGNER, S. A. ET AL. (2001) *World-wide variation in HIV-1 phenotypic susceptibility in untreated individuals: biologically relevant values for resistance testing*, AIDS, **15**(13):1671-7.
- HARRIS, R. S. & LIDDAMENT, M.T. (2004) *Retroviral restriction by APOBEC proteins.*, Nat Rev Immunol, **4**(11):868-77.
- HAUBRICH, R. & DEMETER, L. (2001) *International perspectives on antiretroviral resistance. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations*, J Acquir Immune Defic Syndr, **26**(Suppl 1):51-9.
- HEID, U. (2006) *Phänotypische Resistenzbestimmung gegenüber HIV-1-Proteaseinhibitoren. Vergleich von DNA vs. RNA als Patientenmaterial.*, Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, Max-von-Pettenkofer Institut, München.
- HENEINE, W.; YAMAMOTO, S.; SWITZER, W. M. ET AL. (1995) *Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1*, J Infect Dis, **171**(5):1210-6.
- HERMANKOVA, M.; SILICIANO, J. D.; ZHOU, Y. ET AL. (2003) *Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo*, J Virol, **77**(13):7383-92.
- HERTOGS, K.; BLOOR, S.; KEMP, S. D. ET AL. (2000) *Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples*, Aids, **14**(9):1203-10.
- HERTOGS, K.; DE BETHUNE, M. P.; MILLER, V. ET AL. (1998) *A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs*, Antimicrob Agents Chemother, **42**(2):269-76.
- HIRSCH, M. S.; BRUN-VEZINET, F.; D'AQUILA, R. T. ET AL. (2000) *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel*, Jama, **283**(18):2417-26.
- HOEGL, L.; KORTING, H. C. & KLEBE, G. (1999) *Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: molecular modeling comes of age*, Pharmazie, **54**(5):319-29.
- HOFFMANN, D. (2002) *Ein neuartiges enzymatisches Auswerteverfahren fuer die in vitro Detektion phaenotypischer HIV-1 Proteaseresistenz*, Dissertation an der Ludwig Maximilians Universität, Lehrstuhl für Virologie des Max von Pettenkofer-Institutes, München.
- HOFFMANN, D.; ASSFALG-MACHLEIDT, I.; NITSCHKO, H. ET AL. (2003) *Rapid enzymatic test for phenotypic HIV protease drug resistance*, Biol Chem, **384**(7):1109-17.
- 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**(4):294-9.
- HOGAN, C. M. & HAMMER, S.M. (2001a) *Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses*, Ann Intern Med, **134**(9 Pt 1):761-76.

- HOGAN, C. M. & HAMMER, S.M. (2001b) *Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics*, Ann Intern Med, **134**(10): 978-96.
- HOLGUIN, A.; HERTOQS, K. & SORIANO, V. (2003) *Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes*, Clin Microbiol Infect, **9**(4):323-6.
- HUANG, Z.; MURRAY, M. G. & SECRIST, J.A.3. (2006) *Recent development of therapeutics for chronic HCV infection*, Antiviral Res, **71**(2-3):351-62.
- HUGLE, T. & CERNY, A. (2003) *Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C*, Rev Med Virol, **13**(6):361-71.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A. & SCHULTEN, K. (1996) *VMD: visual molecular dynamics.*, J Mol Graph, **14**(1):33-8, 27-8.
- HUNG, M.; PATEL, P.; DAVIS, S. ET AL. (1998) *Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication*, J Virol, **72**(6):4819-24.
- INGR, M.; UHLIKOVA, T.; STRISOVSKY, K. ET AL. (2003) *Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the "fireman's grip" and dimerization*, Protein Sci, **12**(10):2173-82.
- JACKS, T.; POWER, M. D.; MASIARZ, F. R. ET AL. (1988) *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression*, Nature, **331**(6153):280-3.
- JAGODZINSKI, L. L.; COOLEY, J. D.; WEBER, M. ET AL. (2003) *Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B*, J Clin Microbiol, **41**(3):998-1003.
- JAPOUR, A. J.; MAYERS, D. L.; JOHNSON, V. A. ET AL. (1993) *Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group.*, Antimicrob Agents Chemother, **37**:1095-1101.
- JENWITHEESUK, E. & SAMUDRALA, R. (2005) *Prediction of HIV-1 protease inhibitor resistance using a protein-inhibitor flexible docking approach*, Antivir Ther, **10**(1):157-66.
- JIN, H.; CAI, R. Z.; SCHACHERER, L. ET AL. (2006) *Design, synthesis, and SAR studies of novel and highly active tri-cyclic HIV integrase inhibitors*, Bioorg Med Chem Lett, **16**(15):3989-92.
- JOHANSON, J.; ABRAYAYA, K.; CAMINITI, W. ET AL. (2001) *A new ultrasensitive assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma*, J Virol Methods, **95**(1-2):81-92.
- JOHNSON, A. A.; MARCHAND, C. & POMMIER, Y. (2004) *HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial*, Curr Top Med Chem, **4**(10):1059-77.
- JOHNSON, V. A.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B. ET AL. (2005) *Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005*, Top HIV Med, **13**(1):51-7.
- KANDATHIL, A. J.; RAMALINGAM, S.; KANNANGAI, R. ET AL. (2005) *Molecular epidemiology of HIV*, Indian J Med Res, **121**(4):333-44.
- KAPLAN, A. H. (2002) *Assembly of the HIV-1 core particle*, AIDS Rev, **4**(2):104-11.
- KATZ, R. A. & SKALKA, A.M. (1994) *The retroviral enzymes*, Annu Rev Biochem, **63**:133-73.
- KELLAM, P. & LARDER, B.A. (1994) *Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates*, Antimicrob Agents Chemother, **38**(1):23-30.

- KEULEN, W.; NIJHUIS, M.; SCHUURMAN, R. ET AL. (1997) *Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation*, Science, **275**(5297):229; author reply 230-1.
- KHOO, S. H.; HOGGARD, P. G.; WILLIAMS, I. ET AL. (2002) *Intracellular accumulation of human immunodeficiency virus protease inhibitors*, Antimicrob Agents Chemother, **46**(10): 3228-35.
- KIJAK, G. H.; RUBIO, A. E.; PAMPURO, S. E. ET AL. (2003) *Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms*, HIV Med, **4**(1): 72-8.
- KLABE, R. M.; BACHELER, L. T.; ALA, P. J. ET AL. (1998) *Resistance to HIV protease inhibitors: a comparison of enzyme inhibition and antiviral potency*, Biochemistry, **37**(24):8735-42.
- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R. ET AL. (1971) *Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases.*, J Mol Biol, **56**(2):341-61.
- KORBER, B.; FOLEY, B. T.; KUIKEN, C. ET AL. (1998). *Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG*. In KORBER, B.; KUIKEN, C. L.; FOLEY, B.; HAHN, B.; McCUTCHAN, F.; MELLORS, J. W. & SODROSKI, J. G. (Eds.), Human Retroviruses and AIDS 1998 (1998 Edition), **Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory**, Los Alamos, NM, USA.
- KORN, K.; REIL, H.; WALTER, H. ET AL. (2003) *Quality control trial for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing using clinical samples reveals problems with detecting minority species and interpretation of test results*, J Clin Microbiol, **41**(8):3559-65.
- KOSTOVA, I. (2006) *Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase*, Curr HIV Res, **4**(3):347-63.
- KOTLER, M.; KATZ, R. A.; DANHO, W. ET AL. (1988) *Synthetic peptides as substrates and inhibitors of a retroviral protease*, Proc Natl Acad Sci U S A, **85**(12):4185-9.
- KROHN, A.; REDSHAW, S.; RITCHIE, J. C. ET AL. (1991) *Novel binding mode of highly potent HIV-proteinase inhibitors incorporating the (R)-hydroxyethylamine isostere*, J Med Chem, **34**(11):3340--3342.
- KURT, N.; SCOTT, W. R. P.; SCHIFFER, C. A. ET AL. (2003) *Cooperative fluctuations of unliganded and substrate-bound HIV-1 protease: a structure-based analysis on a variety of conformations from crystallography and molecular dynamics simulations.*, Proteins, **51**(3):409-22.
- LAL, R. B.; CHAKRABARTI, S. & YANG, C. (2005) *Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development*, Indian J Med Res, **121**(4):287-314.
- LARDER, B. A.; CHESEBRO, B. & RICHMAN, D.D. (1990) *Susceptibilities of zidovudine-susceptible and -resistant human immunodeficiency virus isolates to antiviral agents determined by using a quantitative plaque reduction assay*, Antimicrob Agents Chemother, **34**(3): 436-41.
- LARDER, B. A.; HERTOGS, K.; BLOOR, S. ET AL. (2000) *Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples*, AIDS, **14**(13):1943-8.
- LARSON, D. R.; JOHNSON, M. C.; WEBB, W. W. ET AL. (2005) *Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy*, Proc Natl Acad Sci U S A, **102**(43):15453-8.
- LEE, C. G.; GOTTESMAN, M. M.; CARDARELLI, C. O. ET AL. (1998) *HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter*, Biochemistry, **37**(11):3594-601.
- LEIS, J.; BALTIMORE, D.; BISHOP, J. M. ET AL. (1988) *Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses.*, J Virol, **62**(5):1808-9.

-
- LEVY JA (1998): *HIV and the Pathogenesis of AIDS* (2nd Edition). **ASM Press**, Washington.
- LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY (2005): *HIV Sequence Compendium 2005* (2005 Edition). **Theoretical Biology and Biophysics Group**, .
- LOUIS, J. M.; CLORE, G. M. & GRONENBORN, A.M. (1999) *Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding*, Nat Struct Biol, **6**(9):868-75.
- LUCIW, P. (1996). *Human immunodeficiency viruses and their replication*. In FIELDS, B. N. (Ed.), Virology (3rd Edition), **Lippincott-Raven**, Philadelphia.
- MAES, B.; SCHROOTEN, Y.; SNOECK, J. ET AL. (2004) *Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory*, J Virol Methods, **119**(1):45-9.
- MALIM, M. H. (2006) *Natural resistance to HIV infection: The Vif-APOBEC interaction.*, C R Biol, **329**(11):871-5.
- MANSKY, L. M. & TEMIN, H.M. (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**(8): 5087-94.
- MARKGREN, P. O.; HAMALAINEN, M. & DANIELSON, U.H. (2000) *Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology*, Anal Biochem, **279**(1): 71-8.
- MARKGREN, P. O.; SCHAAL, W.; HAMALAINEN, M. ET AL. (2002) *Relationships between structure and interaction kinetics for HIV-1 protease inhibitors*, J Med Chem, **45**(25):5430-9.
- MARQUARDT, D. W. (1963) *An Algorithm for Least Squares Estimation of Parameters*, Journal of the Society of Industrial and Applied Mathematics, **11**:431-441.
- MARX, J. L. (1982) *New disease baffles medical community*, Science, **217**(4560):618-21.
- MASCHERA, B.; FURFINE, E. & BLAIR, E.D. (1995) *Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors*, J Virol, **69**(9):5431-6.
- MATAYOSHI, E. D.; WANG, G. T.; KRAFFT, G. A. ET AL. (1990) *Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer*, Science, **247**(4945):954-8.
- MEYNARD, J.; VRAY, M.; MORAND-JOUBERT, L. ET AL. (2002) *Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial*, AIDS, **16**(5):727-36.
- MILLER, V.; HAUBRICH, R.; KURITZKES, D. (2003) *Understanding Treatment Resistant HIV*, The PRN Notebook, **8**(2):12-19.
- MORITA, E. & SUNDQUIST, W.I. (2004) *Retrovirus budding*, Annu Rev Cell Dev Biol, **20**:395-425.
- MORRISON, J. F. (1982) *The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions*, Trends in Biochemical Sciences, **7**(3):102-105.
- MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. (2003): *Fitting Models To Biological Data Using Linear And Nonlinear Regression. A Practical Guide To Curve Fitting*. (2nd Edition). **Graphpad Software Inc.**, San Diego, CA, USA.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. ET AL. (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **51 Pt 1**:263-73.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2000). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. In THE CLINICAL AND LABORATORY
-

STANDARDS INSTITUTE (Ed.), NCCLS Catalog (2000 Edition), **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**, .

- NAVIA, M. A.; FITZGERALD, P. M.; MCKEEVER, B. M. ET AL. (1989) *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1*, Nature, **337**(6208):615-20.
- NEURATH, H. (1986) *The versatility of proteolytic enzymes*, J Cell Biochem, **32**(1):35-49.
- NILLROTH, U.; VRANG, L.; MARKGREN, P. O. ET AL. (1997) *Human immunodeficiency virus type 1 proteinase resistance to symmetric cyclic urea inhibitor analogs*, Antimicrob Agents Chemother, **41**(11):2383-8.
- NOVAK, R. M.; CHEN, L.; MACARTHUR, R. D. ET AL. (2005) *Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naive patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy*, Clin Infect Dis, **40**(3): 468-74.
- OBERMEIER, M. (2006) *Optimierung und quantitative Auswertung eines hochsensitiven Reverse Transkriptase-Aktivitäts Assays*, Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, Max von Pettenkofer-Institut, München.
- PETROPOULOS, C. J.; PARKIN, N. T.; LIMOLI, K. L. ET AL. (2000) *A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1*, Antimicrob Agents Chemother, **44**(4): 920-8.
- PETTIT, S. C.; EVERITT, L. E.; CHOUDHURY, S. ET AL. (2004) *Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism*, J Virol, **78**(16):8477-85.
- PETTIT, S. C.; LINDQUIST, J. N.; KAPLAN, A. H. ET AL. (2005) *Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates.*, Retrovirology, **2**:66.
- PHYLLIP, L. H.; MILLS, J. S.; PARTEN, B. F. ET AL. (1992) *Intrinsic activity of precursor forms of HIV-1 proteinase*, FEBS Lett, **314**(3):449-54.
- PIERSON, T.; McARTHUR, J. & SILICIANO, R.F. (2000) *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy*, Annu Rev Immunol, **18**:665-708.
- POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M. G.; READ, E. ET AL. (1984) *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*, Science, **224**(4648):497-500.
- POVEDA, E.; BRIZ, V. & SORIANO, V. (2005) *Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection*, AIDS Rev, **7**(3):139-47.
- PRICE, N.; SMIT, E. & PILLAY, D. (2002) *Resistance tests: what do clinical trials tell us?*, J HIV Ther, **7**(4):80-6.
- RANDOLPH, J. T. & DEGOEY, D.A. (2004) *Peptidomimetic inhibitors of HIV protease*, Curr Top Med Chem, **4**(10):1079-95.
- RAVELA, J.; BETTS, B. J.; BRUN-VEZINET, F. ET AL. (2003) *HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms*, J Acquir Immune Defic Syndr, **33**(1):8-14.
- REEVES, J. D. & DOMS, R.W. (2002) *Human immunodeficiency virus type 2*, J Gen Virol, **83**(Pt 6): 1253-65.

-
- REEVES, J. D. & PIEFER, A.J. (2005) *Emerging drug targets for antiretroviral therapy*, Drugs, **65**(13): 1747-66.
- RESH, M. D. (2005) *Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles*, AIDS Rev, **7**(2):84-91.
- RICHMAN, D. D. (2001) *HIV chemotherapy*, Nature, **410**(6831):995-1001.
- RIDKY, T. & LEIS, J. (1995) *Development of drug resistance to HIV-1 protease inhibitors*, J Biol Chem, **270**(50):29621-3.
- ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K. & KUNKEL, T.A. (1988) *The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1*, Science, **242**(4882):1171-3.
- ROSE, R. E.; GONG, Y. F.; GREYTOK, J. A. ET AL. (1996) *Human immunodeficiency virus type 1 viral background plays a major role in development of resistance to protease inhibitors*, Proc Natl Acad Sci U S A, **93**(4):1648-53.
- RUFF, C. T.; RAY, S. C.; KWON, P. ET AL. (2002) *Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure*, J Virol, **76**(18):9481-92.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. & MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning* (2nd Edition). **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, USA.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.*, Proc Natl Acad Sci U S A, **74**(12):5463-7.
- SARMATI, L.; NICASTRI, E.; MONTANO, M. ET AL. (2004) *Decrease of replicative capacity of HIV isolates after genotypic guided change of therapy*, J Med Virol, **72**(4):511-6.
- SCHLEGEL, H. (1992): *Allgemeine Mikrobiologie* (7. Edition). **Georg Thieme Verlag**, Stuttgart.
- SCHUURMAN, R.; BRAMBILLA, D.; DE GROOT, T. ET AL. (2002) *Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations: results from the ENVA-2 genotyping proficiency program*, AIDS Res Hum Retroviruses, **18**(4):243-8.
- SCHUURMAN, R.; DEMETER, L.; REICHELDERFER, P. ET AL. (1999) *Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*, J Clin Microbiol, **37**(7):2291-6.
- SCULLEY, M. J., MORRISON, J. F. (1986) *The determination of kinetic constants governing the slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions*, Biochim. Biophys. Acta, **874**:44-53.
- SCULLEY, M. J.; MORRISON, J. F. & CLELAND, W.W. (1996) *Slow-binding inhibition: the general case*, Biochim Biophys Acta, **1298**(1):78-86.
- SEELMEIER, S.; SCHMIDT, H.; TURK, V. ET AL. (1988) *Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A*, Proc Natl Acad Sci U S A, **85**(18): 6612-6.
- SHAFER, R. W. (2002) *Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance*, Clin Microbiol Rev, **15**(2):247-77.
- SHAFER, R. W.; JUNG, D. R.; BETTS, B. J. ET AL. (2000) *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database*, Nucleic Acids Res, **28**(1):346-8.
- SHAM, H. L.; KEMPF, D. J.; MOLLA, A. ET AL. (1998) *ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease.*, Antimicrob Agents Chemother, **42**:3218-3224.
-

- SHENDEROVICH, M. D.; KAGAN, R. M.; HESELTINE, P. N. ET AL. (2003) *Structure-based phenotyping predicts HIV-1 protease inhibitor resistance*, Protein Sci, **12**(8):1706-18.
- SHOEMAN, R. L.; HONER, B.; STOLLER, T. J. ET AL. (1990) *Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein*, Proc Natl Acad Sci U S A, **87**(16):6336-40.
- SHOEMAN, R. L.; KESSELMIER, C.; MOTHES, E. ET AL. (1991) *Non-viral cellular substrates for human immunodeficiency virus type 1 protease*, FEBS Lett, **278**(2):199-203.
- SHUMAN, C. F.; VRANG, L. & DANIELSON, U.H. (2004) *Improved structure-activity relationship analysis of HIV-1 protease inhibitors using interaction kinetic data*, J Med Chem, **47**(24):5953-61.
- SIMON, F.; MAUCLÈRE, P.; ROQUES, P. ET AL. (1998) *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.*, Nat Med, **4**(9):1032-7.
- SLUIS-CREMER, N.; TEMIZ, N. A. & BAHAR, I. (2004) *Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding*, Curr HIV Res, **2**(4):323-32.
- SNOECK, J.; KANTOR, R.; SHAFER, R. W. ET AL. (2006) *Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent.*, Antimicrob Agents Chemother, **50**:694--701.
- SPIRA, S.; WAINBERG, M. A.; LOEMBA, H. ET AL. (2003) *Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance*, J Antimicrob Chemother, **51**(2): 229-40.
- SPSS INC. (2002) *SigmaPlot® 8.0 Programming Guide*, **SPSS Inc.**, Chicago, IL, USA.
- STELLBRINK, H. J.; VAN LUNZEN, J.; HUFERT, F. T. ET AL. (1997) *Asymptomatic HIV infection is characterized by rapid turnover of HIV RNA in plasma and lymph nodes but not of latently infected lymph-node CD4+ T cells*, AIDS, **11**(9):1103-10.
- STRISOVSKY, K.; TESSMER, U.; LANGNER, J. ET AL. (2000) *Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase: rethinking the "fireman's grip" hypothesis*, Protein Sci, **9**(9):1631-41.
- STURMER, M.; DOERR, H. W. & PREISER, W. (2003a) *Variety of interpretation systems for human immunodeficiency virus type 1 genotyping: confirmatory information or additional confusion?*, Curr Drug Targets Infect Disord, **3**(4):373-82.
- STURMER, M.; DOERR, H. W.; STASZEWSKI, S. ET AL. (2003b) *Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping*, Antivir Ther, **8**(3):239-44.
- SWAIN, A. L.; MILLER, M. M.; GREEN, J. ET AL. (1990) *X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate-based hydroxyethylamine inhibitor.*, Proc Natl Acad Sci U S A, **87**(22):8805-9.
- TOMASSELLI, A. G. & HEINRIKSON, R.L. (2000) *Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective*, Biochim Biophys Acta, **1477**(1-2):189-214.
- TOMICH, P.; BOHANON, M.; LYNN, J. ET AL. (1994) *Discovery and properties of small organic molecule inhibiting HIV-1 protease*. Keystone Symposium on Structural and Molecular Biology of Protease Function and Inhibition, Santa Fe, NM, USA
- TORTI, C.; QUIROS-ROLDAN, E.; KEULEN, W. ET AL. (2003) *Comparison between rules-based human immunodeficiency virus type 1 genotype interpretations and real or virtual phenotype: concordance analysis and correlation with clinical outcome in heavily treated patients.*, J Infect Dis, **188**:194--201.

-
- TURAL, C.; RUIZ, L.; HOLTZER, C. ET AL. (2002) *Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial*, AIDS, **16**(2):209-18.
- VAN LAETHEM, K.; DE LUCA, A.; ANTINORI, A. ET AL. (2002) *A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients*, Antivir Ther, **7**(2):123-9.
- VAN LAETHEM, K.; VAN VAERENBERGH, K.; SCHMIT, J. C. ET AL. (1999) *Phenotypic assays and sequencing are less sensitive than point mutation assays for detection of resistance in mixed HIV-1 genotypic populations*, J Acquir Immune Defic Syndr, **22**(2):107-18.
- VANDAMME, A. M.; SÖNNERBORG, A.; AIT-KHALED, M. ET AL. (2004) *Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing.*, Antivir Ther, **9**(6):829-48.
- VIERLING, P. & GREINER, J. (2003) *Prodrugs of HIV protease inhibitors*, Curr Pharm Des, **9**(22):1755-70.
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979) *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*, Proc Natl Acad Sci U S A, **76**(2):615-9.
- VON DER HELM, K. (1996) *Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy*, Biol Chem, **377**(12):765-74.
- VON DER HELM, K.; SEELMEIER, S.; KISSELEV, A. ET AL. (1994) *Identification, purification, and cell culture assays of retroviral proteases*, Methods Enzymol, **241**:89-104.
- WEBER, I. T.; MILLER, M.; JASKOLSKI, M. ET AL. (1989) *Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site*, Science, **243**(4893):928-31.
- WEISS, C. D. (2003) *HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition*, AIDS Rev, **5**(4):214-21.
- WELKER, R.; HOHENBERG, H.; TESSMER, U. ET AL. (2000) *Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1*, J Virol, **74**(3):1168-77.
- WENSING, A. M. J.; VAN DE VIJVER, D. A.; ANGARANO, G. ET AL. (2003) *Enhanced prediction of lopinavir resistance from genotype by use of artificial neural networks*, J Infect Dis, **188**:653-60.
- WHITEHURST, N.; CHAPPEY, C.; PETROPOULOS, C. ET AL. (2003) *Polymorphisms in p1-p6/p6* of HIV type 1 can delay protease autoprocessing and increase drug susceptibility*, AIDS Res Hum Retroviruses, **19**(9):779-84.
- WONG, J. K.; HEZAREH, M.; GUNTARD, H. F. ET AL. (1997) *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*, Science, **278**(5341):1291-5.
- YAMAOKA, K.; NAKAGAWA, T.; TANAKA, H. ET AL. (1985) *A nonlinear multiple regression program, MULTI2 (BAYES), based on Bayesian algorithm for microcomputers.*, J Pharmacobiodyn, **8**(4):246-56.
- YEAGER, M.; WILSON-KUBALEK, E. M.; WEINER, S. G. ET AL. (1998) *Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: implications for retroviral assembly mechanisms*, Proc Natl Acad Sci U S A, **95**(13):7299-304.
- ZHU, T.; KORBER, B. T.; NAHMIA, A. J. ET AL. (1998) *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*, Nature, **391**(6667):594-7.

7.9 LEBENS LAUF

Person

Name	Müller-Sarnowski
Vornamen	Felix Richard Erich
e-mail	felix@mueller-sarnowski.de
Geburtsdatum	11.01.1977
Geburtsort	München
Staatsangeh.	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983 - 1987	Grundschule an der Albert-Schweitzer-Strasse, Ottobrunn
1987 - 1996	Gymnasium Ottobrunn, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig Leistungskurse Latein und Biologie
1996	Allgemeine Hochschulreife und Test für medizinische Studiengänge

Zivildienst

1996 - 1997	Zivildienst als OP-Pfleger, Poliklinikum Innenstadt der LMU, München
-------------	--

Hochschulbildung

1997 - 2005	Studium der Humanmedizin an der LMU München
2000	Ärztliche Vorprüfung
2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004 - 2005	Praktisches Jahr
2004	Neurologie Friedrich-Baur-Institut, Klinikum Innenstadt, LMU München
2004	Innere Medizin Gastroenterologie: Krankenhaus Harlaching, LMU München Pneumologie: St Johns Hospital, Livingston, Grossbritannien Endokrinologie: Western General Hospital, Edinburgh, Grossbritannien
2004 - 2005	Chirurgie Intensivstation und Notaufnahme, Krankenhaus Harlaching, LMU München
2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation

Stipendien

2002 - 2003	DFG Graduiertenkolleg Nr. 303 <i>Infektion und Immunität</i>
2005 - 2006	Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft in der Neurologie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München.

Berufliche Tätigkeit

2005 - 2006	Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft in der Neurologie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München (MPI).
2006 - 2007	Arzt in der Neurologie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München

Berufliche Tätigkeit

seit 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe <i>Multiple Sklerose</i> des MPI. Mitbetreuung der Spezialambulanz für Multiple Sklerose
seit 11/2007	Arzt in der Tagklinik für Psychiatrie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München
Ehrenamtliches Engagement und Nebentätigkeiten	
<hr/>	
1994 - 1995	Bezirks-Schülersprecher Oberbayern-Ost und Schülersp. Gym. Ottobrunn
1995 - 1997	Mitglied im Hauptausschuss des Bayerischen Jugendrings
1995	Schülervertreter bei der Kommission <i>Weiterentwicklung der Prinzipien der gymnasialen Oberstufe und des Abiturs</i> der Kultusministerkonferenz
1995 - 1997	Mitglied des bayerischen Landesschulbeirates
1995 - 1997	Tätigkeit im Vorstand der Landeschülervertretung Bayern e.V.
seit 1996	Mitglied des internationalen Münchner Presseclubs
2002 - 2005	Einrichtung und Administration der Internetseiten des interdisziplinären Kurses <i>Infektionskrankheiten und Immunologie (IKI)</i> des Harvard-München-Programmes Einrichtung und Administration eines Bioinformatik-Servers mit Open Source Technologien (www.bioinformatix.org) und einer Institutshomepage auf Basis eines Content Management Systems am Max von Pettenkofer-Institut der LMU, München
2004 - 2005	PJ-Sprecher Krankenhaus München Harlaching
seit 2006	Einrichtung und Administration einer Informationshomepage und eines Podcasts für Multiple Sklerose Patienten (www.ms-ambulanz.info)
seit 2006	Gründungsmitglied und Vorsitzender der <i>Medizinischen Gesellschaft München e.V.</i>
2007	Neurologieunterricht im Rahmen der Fachweiterbildung für Psychiatrische Pflege der Universitätskliniken München

7.10 IMPRESSUM

Die Informationen in diesem Buch wurden mit größter Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht völlig ausgeschlossen werden. Verlag und Autor übernehmen keinerlei juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene Fehler und deren Folgen.

Alle Warennamen werden ohne Gewährleistung der freien Verwendbarkeit benutzt und sind möglicherweise eingetragene Warenzeichen. Der Autor richtet sich im Wesentlichen nach den Schreibweisen der Hersteller.

© Copyright 2007 Felix Müller-Sarnowski, felix@mueller-sarnowski.de

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Soweit nicht anders vermerkt, sind alle Bestandteile unter einem *Creative Commons Namensnennung 2.0 Deutschland Lizenzvertrag* lizenziert. Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/de/> oder schicken Sie einen Brief an Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California 94105, USA.



Bitte beachten Sie, dass Teile des Werkes, wie z. B. einzelne Abbildungen, die von Dritten lizenziert wurden, womöglich NICHT dem *Creative Commons Namensnennung 2.0 Deutschland Lizenzvertrag* unterliegen. Die deutliche Kennzeichnung solcher Inhalte obliegt dem Autor. Der Autor hat gegenüber dem Verlag versichert, dass das Werk, bis auf entsprechend gekennzeichnete Inhalte, frei von Rechten Dritter ist. Sollten diesbezügliche Zweifel bestehen, bitten wir Sie, sich direkt beim Autor rückzuversichern. Der Verlag übernimmt keinerlei Haftung für aus einer fehlenden bzw. fehlerhaften Kennzeichnung resultierende Verletzung von Rechten Dritter.

Zitate

Um die Rechte des *Creative Commons Namensnennung 2.0 Deutschland Lizenzvertrages* in Anspruch zu nehmen, müssen bibliografische Hinweise mindestens folgende Informationen beinhalten: Name des Autors, Jahr der Publikation, Titel, Verlag. Bei digitalen Objekten, wie z. B. Dateien im *portable document format (pdf)*, muss zusätzlich ein *persistant identifier* wie z.B. ein DOI oder URN angegeben werden. Bei elektronischen Publikationen ist ein Link auf die Internetseite des Verlages zu setzen (www.mucmed.org).

1. Auflage November 2007, München im Verlag der Medizinischen Gesellschaft München.

ISBN 978-3-940847-01-0 (pdf)

DOI 10.3236/ISBN978-3-940847-01-0

ISBN 978-3-940847-02-7 (print on demand)

Medizinische Gesellschaft München e. V.

Meindlstr. 11

81373 München

Deutschland

<http://www.mucmed.org>

verlag@mucmed.org

Elektronische Version

Eine elektronische Version des Werkes im *portable document format (pdf)* kann u. a. über die Universitätsbibliothek der Ludwig Maximilian Universität München unter der URL <http://edoc.uib.uni-muenchen.de>, oder die Homepage der Medizinischen Gesellschaft München unter <http://www.mucmed.org> kostenfrei bezogen werden.

Elektronische Versionen des Werkes enthalten evtl. *Hyperlinks* als Verknüpfung zu externen Internetseiten. *Hyperlinks* sind lediglich im Sinne von Quellenangaben zu deuten. Ihre Gültigkeit beschränkt sich auf den Zeitpunkt der Verlinkung. Autor und Verlag haben keinen Einfluss auf die sich möglicherweise rasch verändernden Inhalte der verlinkten Internetseiten und sind deshalb auch nicht für deren Inhalte verantwortlich. Die Gültigkeit der URLs wurde zwar zum Zeitpunkt der Verlinkung überprüft, ist ob des raschen Wandels von Internetseiten aber leider nicht für die Zukunft garantiert.

Aus technischen Gründen enthält die elektronische Version im *portable document format* ausschließlich Pixelabbildungen bis max. 150 dpi. Andere Dateiformate sind ggf. über den Autor erhältlich.

print on demand

Gedruckte Ausgaben dieses Werkes werden auf für die Langzeitarchivierung geeignetem Papier gemäß der ISO-Norm 9706 hergestellt. Aktuelle Preise der gedruckten Ausgabe erfahren Sie über die Homepage der Medizinischen Gesellschaft München (www.mucmed.org) oder im Buchhandel.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.



Am Max von Pettenkofer-Institut wurde ein enzymkinetischer Assay der HIV-Protease entwickelt. Nach spezifischer Amplifikation des Genoms der HIV-Protease aus Blut infizierter Patienten wird das Enzym rekombinant exprimiert und seine Aktivität in Gegenwart verschiedener Inhibitor-konzentrationen mithilfe eines künstlichen Substrates in einem Fluoreszenzassay ermittelt. Ein Vergleich mit Wildtypprotease erlaubt die Berechnung anschaulicher Resistenzfaktoren. Insbesondere hinsichtlich Geschwindigkeit, Kosten und Spezifität stellt das System eine attraktive Alternative zu den bekannten Verfahren dar.

