

## **2 Material**

### **2.1 Studienkollektiv**

Die PatientInnen des Studienkollektives wurden im Rahmen der HIV-Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes rekrutiert, die 1997 zur Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Progression der Erkrankung, Verbreitung der HIV-Subtypen und Übertragung resistenter Viren in Deutschland begonnen wurde (Brunn *et al.* 1999; Kücherer und Fischer 2001).

Die Studienkohorte umfasst sowohl prospektiv aufgenommene HIV-Infizierte als auch retrospektiv identifizierte Serokonverter. Als Datum der Serokonversion ist das arithmetische Mittel zwischen dem bekannten Datum des letzten negativen HIV-Antikörpertestes und dem ersten positiven HIV-Infektionsnachweis (Antikörpernachweis oder HIV-RNA-Nachweis) definiert. Zwischen diesen beiden Testdaten darf höchstens ein Zeitraum von drei Jahren liegen. HIV-Infizierte, die sich in der akuten Phase der Infektion befanden (Nachweis des Virusgenoms), wurden ebenfalls in die Untersuchung aufgenommen. Die Infektion und die nachfolgende Serokonversion des betreffenden Patienten wurde durch Verlaufsuntersuchungen bestätigt. Neben den Daten zur Serokonversion werden in der Studie demographische Angaben, Infektionsrisiko, Labordaten und klinische Daten der TeilnehmerInnen erfasst (Zusammenarbeit mit der infektionsepidemiologischen Abteilung des RKI).

Bis zum 30. April 2001 konnten 956 TeilnehmerInnen in die Serokonverterstudie aufgenommen werden. Aus diesem Gesamtkollektiv wurden geeignete Subkollektive für epidemiologische Studien, Subtypen- und Resistenzbestimmungen gebildet. Für Resistenzbestimmungen (Subkollektiv 3) lagen bis zum 31. Dezember 2001 von 151 TeilnehmerInnen der Serokonverterstudie EDTA-Blutproben vor Beginn einer antiretroviralen Therapie vor.

### **2.2 eukaryonte Zellen**

#### **293 bzw. 293T**

Bei der Zelllinie 293 handelt es sich um eine Adenovirus Typ 5 transformierte humane embryonale Nierenzelle (Graham *et al.* 1977). Die Zelllinie zeichnet sich durch semiadhärentes Wachstum und gute Transfizierbarkeit aus. Die verwendete Zelllinie 293T entspricht der

Zelllinie 293, exprimiert im Gegensatz zu dieser jedoch das T-Antigen von SV40 (DuBridge *et al.* 1987).

### **CEMx174**

Die humane CD<sup>4+</sup>-Zelllinie CEMx174 ist ein Fusionsprodukt aus der humanen B-Zelllinie 721-174 und der humanen T-Zelllinie CEM. Die in Aggregaten wachsenden Suspensionszellen sind leicht mit SIV bzw. HIV infizierbar und gut für Infektionsstudien geeignet (Salter *et al.* 1985).

### **CEMx174-SEAP**

Die Zelllinie CEMx174-SEAP basiert auf der Linie CEMx174 und enthält zusätzlich ein Gen, das für eine humane plazentale Alkalische Phosphatase codiert das unter der Kontrolle des HIV-1-LTR Promotors steht. Werden diese Zellen mit HIV infiziert, wird das viruscodierte Tat-Protein exprimiert, das durch Bindung an das TAR-Element den Promotor transaktiviert (siehe Kapitel 1.3.2.1), so dass die Alkalische Phosphatase exprimiert und in den Zellkulturüberstand sezerniert wird (Means *et al.* 1997). Durch Quantifizierung der Aktivität der sezernierten Alkalischen Phosphatase kann auf die Vermehrungsfähigkeit der infizierenden Viren geschlossen werden.

## **2.3 Bakterienstämme (Stratagene GmbH)**

### ***E.coli* XL1-Blue**

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac*<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

### ***E.coli* XL2-Blue**

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac*<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]<sup>a</sup>

## **2.4 Enzyme**

**Taq-DNA-Polymerase** (*Thermus aquaticus*; InVitek, Berlin)

**High Fidelity Pwo/Taq-DNA-Polymerase** (*Pyrococcus woesei* und *Thermus aquaticus*; Boehringer, Mannheim)

**Restriktionsenzyme** *XbaI*, *ApaI* (Bsp120), *NheI*, *HindIII* (Promega, Deisenhofen)

**T4-DNA-Ligase** (Promega, Deisenhofen)

**Taq Cycle Sequencing<sup>®</sup> Kit** (AB Biosystems, Weiterstadt)

**ViroSeq<sup>®</sup> HIV-1 Genotyping System Kit Sequencing Modul** (AB Biosystems, Weiterstadt)

**Superscript<sup>®</sup> Reverse Transkriptase** (Gibco BRL, USA)

## 2.5 Plasmide

**pNL4.3 (EMBL-Datenbankeintrag No. M19921)**

pUC18-Vektor mit proviralem HIV-1 Genom (NL4.3) flankiert von genomischer DNA, Ampicillinresistenz, Größe: 15 kb

**pH5DPRT (Walter *et al.* 1999):**

pNL4.3 mit 1,2 kb-Deletion im *pol*-Gen des HIV-Provirus, Größe 13,8 kb

**pBlueskript II SK(+)** (pBSSK<sup>+</sup>, Stratagene GmbH):

*fl* (-) *ori*, *ColE1 ori*, *lacI* (nicht funktionell), *lacZ* (für Blau-Weiss-Selektion), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T3- und T7-Promotoren, Ampicillinresistenz, Größe: 3,0 kb

**pBT1 (Wain-Hobson *et al.* 1985)**

pBR322-Vektor mit proviralem HIV-1 Genom (LAI/BRU), dessen LTR *SacI*-geschnitten ist, Ampicillinresistenz, Größe 12 kb

## 2.6 Nukleinsäuren

**Aktivierte Kalbsthymus-DNA** (Sigma, Deisenhofen)

**MS2-Phagen RNA** EMBL-Datenbankeintrag No. J02467 (Roche, Basel)

## 2.7 Oligonukleotide (TIB Molbiol, Berlin)

Die zur Sequenzierung und Amplifizierung von DNA verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind im Kapitel 3 aufgeführt.

## 2.8 Chemikalien

Agarose (ultra pure) Ampicillin (Bio-Rad, USA); Bacto-Agar, Bacto-Trypton (Gibco/BRL, USA); Bromphenolblau, Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg); Ethanol (Merck, Darmstadt); Fötale Kälberserum (Gibco/BRL, USA) H<sub>2</sub>O RNase frei (Fluka, Seelze), L-Glutamin (Gibco/BRL, USA); Isopropanol (Merck, Darmstadt); Natriumchlorid (Merck, Darmstadt); Mineralöl (PCR) (Sigma, Deisenhofen)

## 2.9 Technische Geräte

Zellzählapparatur (Easy Count 1, Schärfe Reutlingen); Elisa-Lesegerät (Easy Reader, EAR 400AT, SLT Lab Instruments); Tischzentrifuge (Eppendorf), Laborzentrifuge (Sorvall), SpeedVac (Savant), Ultrazentrifuge (Beckmann); Spektrometer (LKB Ultrospec III, Pharmacia); Thermozykler (Perkin Elmer); Zellkultur-Inkubatoren (Heraeus); Gelektrophorese-Kammer (Horizon 58, Gibco/BRL, USA); ABI Prism<sup>TM</sup>-7700-Sequenzierungsautomat, TaqMan (AB Biosystems, Weiterstadt), SpektraFluor Plus<sup>®</sup> (Tecan, Crailsheim)

## 2.10 Materialien für Zellkultur

Sterile Einwegartikel zur Zellkultur wurden von der Firma Nunc Intermed (Wiesbaden) bezogen. Alle in der Zellkultur oder für molekularbiologischen Methoden verwendeten Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.