

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin

Dissertation

Antiretrovirale Therapie und Resistenz
von HIV-1

Susanne Duwe

Juni 2002

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Juni 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Pauli der Abteilung Neuartige Erreger des Robert Koch-Instituts Berlin angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation am Robert Koch-Institut in Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Pauli selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Susanne Duwe

Berlin, im Juni 2002

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Georg Pauli
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Datum der Disputation: 25.11.2002

"Die Infektionskrankheiten sind eines der wenigen wirklichen Abenteuer, die es auf der Welt noch gibt. Die Drachen sind alle tot, und die Lanze verrostet in der Ecke am Kamin . . .

So ungefähr die einzige sportliche Herausforderung, die durch die restlose Züchtung der menschlichen Rasse noch nicht geschmälert wurde, ist der Kampf gegen jene grausamen kleinen Mitgeschöpfe, die in dunklen Winkeln nisten und sich in Körper von Ratten, Mäusen und allen möglichen Haustieren heranpirschen, die mit Insekten fliegen und krabbeln und uns beim Essen, Trinken und sogar beim Lieben auflauern."

Hans Zinsser, 1935

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie der HIV-Infektion.....	1
1.2	Herkunft und Heterogenität der Humanen Immundefizienzviren.....	1
1.3	Virologische Grundlagen.....	3
1.3.1	Morphologie.....	3
1.3.2	Organisation des viralen Genoms.....	4
1.3.3	Replikation von HIV-1.....	13
1.4	Antiretrovirale Therapie der HIV Infektion.....	17
1.4.1	Ziele antiretroviraler Therapie.....	17
1.4.2	Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI).....	18
1.4.3	Proteaseinhibitoren (PI).....	20
1.4.4	Kombination der antiretroviralen Substanzen (HAART).....	21
1.5	Therapieversagen und Resistenzentwicklung	21
1.6	Resistenz gegen antiretrovirale Wirkstoffe.....	23
1.6.1	Resistenz gegen Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI).....	23
1.6.2	Resistenz gegen Proteaseinhibitoren (PI).....	27
1.6.3	Subtyp-spezifische Resistenz (natürliche Polymorphismen).....	28
1.7	Methoden der Resistenztestung.....	29
1.7.1	Genotypische Resistenzbestimmung.....	29
1.7.2	Phänotypische Resistenzbestimmung.....	30
1.8	Aufgabenstellung.....	30
2	Material	31
2.1	Studienkollektiv.....	31
2.2	eukaryonte Zellen.....	32
2.3	Bakterienstämme	32
2.4	Enzyme.....	32
2.5	Plasmide.....	33
2.6	Nukleinsäuren.....	33
2.7	Oligonukleotide.....	33
2.8	Chemikalien.....	34
2.9	Technische Geräte.....	34
2.10	Materialien für Zellkultur.....	34

3	Methoden	35
3.1	Extraktion viraler RNA	35
3.2	Synthese der cDNA aus RNA.....	36
3.3	Semi-Nested PCR zur Amplifizierung der DNA.....	37
3.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.5	Aufreinigung von DNA.....	40
3.6	Quantifizierung von DNA-Proben.....	40
3.7	DNA-Sequenzierung.....	41
3.8	Phylogenetische Analyse.....	43
3.9	Klonierung der <i>pol</i> -Fragmente.....	46
3.10	Transformation.....	47
3.11	Isolierung der rekombinanten Plasmide.....	49
3.12	Restriktionsanalyse der Plasmide.....	49
3.13	Herstellung von Virusstocks durch Transfektionen von adhärenenten Zellen.....	49
3.14	Quantifizierung der HIV-Vermehrung.....	50
	3.14.1 Messung der sekretierten Alkalischen Phosphatase (SEAP).....	50
	3.14.2 HIV-1-p24-Antigen-Assay.....	51
	3.14.3 Bestimmung des Virustiters.....	51
	3.14.4 env-TaqMan-PCR	52
3.15	Nachweis der Reversen Transkriptase-Aktivität mit dem TaqMan-RT-Test.....	55
	3.15.1 Partikelpräparation.....	55
	3.15.2 cDNA-Synthese.....	55
	3.15.3 TaqMan-PCR zur Quantifizierung der RT-Aktivität.....	56
3.16	Kultur humaner Zelllinien.....	57
	3.16.1 Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen.....	57
	3.16.2 Zellpflege.....	57
	3.16.3 Zellzahlbestimmung.....	58
	3.16.4 Mykoplasmen Test.....	58
3.17	Genotypische Resistenzbestimmung.....	59
3.18	Phänotypische Resistenzbestimmung.....	60
3.19	Wachstumskinetik einer HIV-1 Infektion.....	61

4	Ergebnisse	62
4.1	Übertragung resistenter HIV 1.....	62
4.1.1	Geografische Herkunft und Häufigkeit verschiedener Übertragungsrisiken im Studienkollektiv.....	62
4.1.2	Anteil akuter Infektionen unter therapie-naiven Serokonvertern.....	63
4.1.3	Amplifizierung und Sequenzierung des HIV <i>pol</i> -Fragments.....	64
4.1.4	Übertragung genotypisch resistenter HIV unter therapie-naiven Serokonvertern	65
4.1.5	Überprüfung des <i>in vitro</i> Phänotyps von Viren mit vorhergesagten Resistenzeigenschaften.....	71
4.2	Trendanalyse der Übertragungshäufigkeit resistenter HIV-1.....	75
4.3	Nachweis minoritärer Virusvarianten.....	77
4.4	Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit Therapieversagen und bei therapie-naiven Patienten.....	80
4.5	Mutationen in der <i>gag/pol</i> -Schnittstelle resistenter HIV-1.....	83
4.6	Identifikation möglicher Infektketten und des Subtyps der Infektion.....	84
4.6.1	Überprüfung auf mögliche Infektketten und Kontamination.....	84
4.6.2	Identifikation des Subtyps der Infektion.....	87
4.7	Resistenzen aufgrund natürlicher Polymorphismen (Subtypspezifische Resistenzen).....	89
4.8	Untersuchung der viralen Fitness antiretroviral resistenter HIV-1.....	91
4.8.1	Etablierung und Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der viralen Fitness von HIV-1 Isolaten.....	95
4.8.2	Vergleich der Vermehrungsfähigkeit (virale Fitness) rekombinanter antiretroviral resistenter und sensitiver HIV-1	97
4.9	RT-Aktivität rekombinanter resistenter HIV-1.....	103
5	Diskussion	106
5.1	Übertragung resistenter HIV-1.....	106
5.2	Dynamik der Übertragung resistenter HIV.....	110
5.3	Vergleich der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalyse.....	111
5.4	Klinische Relevanz der Resistenzbestimmung.....	113
5.5	Auswirkung natürlicher Resistenzen auf die Therapierbarkeit von HIV-1 non-B-Infektionen	113
5.6	Virale Fitness resistenter HIV-1.....	114
5.7	Reverse Transkriptase Aktivität resistenter HIV-1.....	117
5.8	Perspektiven.....	118

6	Zusammenfassung	121
7	Summary	123
8	Literatur	125
9	Abkürzungsverzeichnis	149
10	Anhang	151
11	Danksagung	159

Abbildungsverzeichnis

1	Schematischer Aufbau und elektronenmikroskopische Darstellung von HIV-1.....	4
2	Proviraies HIV-1 Genom	5
3	Bändermodell der HIV-1 Protease.....	8
4	Bändermodell der HIV-1 Reversen Transkriptase.....	10
5	Schematische Darstellung der semi nested RT-PCR des <i>pol</i> -Fragmentes.....	60
6	Anzahl therapie-naiver Patienten in Abhängigkeit des Serokonversionsjahres.....	62
7	Phylogenetische Analyse von HIV-1 Isolaten.....	88
8	Genomstruktur von HIV-1 des Subtyps CRF02-AG (IBNG-like).....	90
9	Wachstumskinetik von HIV-1 NL4.3-Wildtypvirus nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1): p24-Ag-Konzentration und SEAP-Aktivität.....	96
10	Wachstumskinetik von HIV-1 NL4.3-Wildtypvirus nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1): infektiöser Titer und SEAP-Aktivität.....	97
11	Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1): SEAP-Aktivität.....	98
12	Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1): p24-Antigen-Konzentration.....	98
13	Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1): Infektiöser Titer (TCID ₅₀).....	99
14	TaqMan env-PCR zur Quantifizierung von HIV-1 RNA nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen mit rekombinanten HIV-1.....	101
15	Replikationseffizienz resistenter HIV Klone im Vergleich zu sensitivem Wildtyp (69h p.i. CEMx174-SEAP Zellen).....	102
16	Vergleich der RT-Aktivität resistenter und sensibler HIV-1 (69h p.i. CEMx174-SEAP Zellen).....	104

Publikationen:

Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kucherer C.
Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Mar 1;26(3):266-73.

Duwe S, Fleischer C, Knodler B, Kuhl P, Pauli G, Ellerbrok H.
The HTLV type I sequence from an asymptomatic German blood donor is related to sequences from South America. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 Dec 20;14(18):1645-7.

Van Dooren S, Gotuzzo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, **Duwe S**, Ellerbrok H, Grassmann R, Hagelberg E, Desmyter J, Vandamme AM.
Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus [type I] in Latin America. *J Gen Virol.* 1998 Nov;79 (Pt 11):2695-708.