

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion

Das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) (Barre-Sinoussi *et al.* 1983, Popovic *et al.* 1984) und das HIV-2 (Starcich *et al.* 1986) sind als Verursacher der Immunschwächeerkrankung AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*) identifiziert und charakterisiert. HIV/AIDS stellen global gesehen seit dem Auftreten der ersten AIDS-Fälle Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Ende des Jahres 2001 waren weltweit mehr als 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert, davon leben 89% in Ländern der Dritten Welt (UNAIDS 2001).

Nach Erhebungen des Robert Koch-Instituts leben in Deutschland ca. 38.000 Menschen mit einer HIV-Infektion, pro Jahr werden ca. 2000 Neuinfektionen geschätzt (Epidemiologisches Bulletin 05/2002). 50% aller HIV-Infektionen in Deutschland wurden durch homo- und bisexuelle Kontakte bei Männern erworben. Etwa 21% der neu diagnostizierten HIV-Infektionen entfallen auf MigrantInnen aus Ländern mit hoher HIV-Prävalenz und vorwiegend heterosexuellem Übertragungsweg. Während weltweit die heterosexuell übertragenen HIV-Infektionen mit über 90% den überwiegenden Anteil der Infizierten stellen, beträgt in Deutschland der Anteil der Personen, die eine HIV-Infektion auf heterosexuellem Weg erworben haben 18%. 10% der Neuinfektionen erfolgten durch kontaminierte Injektions-spritzen bei i.v. Drogengebrauch. Die vertikale Transmission des Virus (Mutter - Kind) beträgt in Deutschland aufgrund geeigneter Präventionsmaßnahmen weniger als 1%, so dass weniger als 400 Kinder unter 13 Jahren HIV infiziert sind.

1.2 Herkunft und Heterogenität der Humanen Immundefizienzviren

HIV-1 und HIV-2 sind die alleinigen Vertreter der Lentivirusfamilie unter den humanpathogenen Retroviren. SIV-Infektionen (Simianes Immundefizienz Virus) hingegen sind bisher bei 27 nicht-humanen Primatenarten bekannt, wovon die SIV-Isolate aus 13 unterschiedlichen Primatenspezies vollständig charakterisiert sind und in 5 distinkte Gruppen gegliedert werden. Die erste Gruppe enthält Isolate von drei Spezies; SIV_{mnd}, SIV_{hoest}, SIV_{sun} (Mandrill, L'Hoest Monkey, Sun-Sailed Monkey). In der zweiten Gruppe befinden sich vier Spezies mit vier spezifischen SIV (SIV_{agm}; African Green Monkey). Die dritte Gruppe wird von SIV_{sm} (Sooty Mangabee) und SIV_{mac} (Rhesusaffen) gebildet, wobei das SIV der Rhesusaffen nachweislich erst durch Übertragung von Halsbandmangaben (Sooty Mangabee) in Gefangenschaft entstand.

Zwischen den SIV_{sm} und HIV-2 besteht eine enge phylogenetische Verwandtschaft, so dass die Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*) als Primatenreservoir des HIV-2 identifiziert wurden (Gao *et al.* 1999). Die sechs unterschiedlichen Subtypen des humanen Immundefizienzvirus Typ 2 entstanden wahrscheinlich durch sechs unterschiedliche Transmissionsereignisse. In der vierten Gruppe der SIV ist nur ein Isolat vollständig charakterisiert, das *in vitro* einen stark eingeschränkten Wirtszelltropismus zeigt, das SIV_{syk} (Sykes Monkey). Die fünfte Gruppe enthält das SIV_{cpz} (Schimpansen), von dem angenommen wird, dass es den Ursprung und das Reservoir des HIV-1 darstellt.

Demnach entstand HIV-1 nach dem Überschreiten der Speziesbarriere durch wahrscheinlich drei unterschiedliche zoonotische Transmissionen von SIV_{cpz} auf den Menschen, womit die drei HIV-1 Gruppen M, N und O erklärt werden können. Weitere Diversifikation im Menschen führte dann vermutlich zur Ausbildung der einzelnen Subtypen (Gao *et al.* 1999, Hahn *et al.* 2000). Die weltweit überwiegende Mehrheit der HIV-1 Stämme, die für die Pandemie verantwortlich sind, gehören zur Gruppe M (*major*). Innerhalb dieser Gruppe befindet sich eine phylogenetische Substruktur, die die Klassifizierung von HIV-1 der Gruppe M in Subtypen (A-D, F-H, J und K) ermöglicht. Weltweit am häufigsten sind Subtyp C-Infektionen, in Nordamerika und Europa dominiert Subtyp B, der einen Sub-Subtyp von Subtyp D darstellt. Innerhalb der Subtypen A und F wird aufgrund der phylogenetischen Struktur in weitere Subklassen unterschieden (Triques *et al.* 2000, Gao *et al.* 2001).

Im Anschluss an die Bezeichnung der Subtypen der Gruppe M, wurden verschiedene Isolate identifiziert, die abhängig von der untersuchten genomischen Region in phylogenetischen Analysen in verschiedenen monophyletischen Gruppen lokalisiert sind (Robertson *et al.* 1995). Diese Mosaikviren (CRF, *Circulating Recombinant Forms*) entstehen durch eine gleichzeitige Infektion der Zelle mit zwei verschiedenen Proviren unter Ausbildung von „heterozygoten“ Virionen, in denen je ein RNA Transkript von jedem Provirus enthalten ist. In der nachfolgenden Infektion einer neuen Zelle erzeugt die Reverse Transkriptase durch mehrmaliges Wechseln zwischen den beiden RNA Vorlagen (Matrize) eine neu synthetisierte retrovirale DNA-Sequenz, die aus den beiden Elterngenomen rekombiniert ist (Goodrich und Duesberg 1990, Hu *et al.* 1990, Stuhlmann *et al.* 1992). Die Hypothese der Entstehung solcher Mosaikviren durch „Rekombination“ wird durch die Existenz einzelner Bruchstellen (*breakpoints*) unterstützt, die in den viralen Genomen durch Zugehörigkeit zu unterschiedlichen monophyletischen Gruppen identifiziert werden. Einige dieser Mosaikviren wurden in verschiedenen, epidemisch unverknüpften Personen identifiziert und sind für die globale AIDS Epidemie von Bedeutung (Carr *et al.* 1998).

HIV-1 der Gruppe O (*outlier*) scheinen in Kamerun und den benachbarten Ländern in West/Zentral Afrika endemisch zu sein, jedoch repräsentieren diese Viren sogar dort eine Minderheit mit einer Prävalenz von 2-5% der HIV positiven Proben (Zekeng *et al.* 1994, Gürtler *et al.* 1996). Innerhalb dieser Gruppe werden aufgrund der genetischen Diversität fünf Subcluster unterschieden (Yamaguchi *et al.* 2002). HIV-1 der Gruppe N (non-M, non-O) werden bisher von einer kleinen Anzahl von Isolaten aus Patienten aus Kamerun vertreten (Simon *et al.* 1998, Ayouba *et al.* 2000).

Ob und in welchem Ausmaß Unterschiede in den biologischen Eigenschaften der Subtypen zu dem divergenten Ausbreitungsmuster und zu Unterschieden im Krankheitsverlauf beitragen, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Kücherer und Fischer 2001).

1.3 Virologische Grundlagen

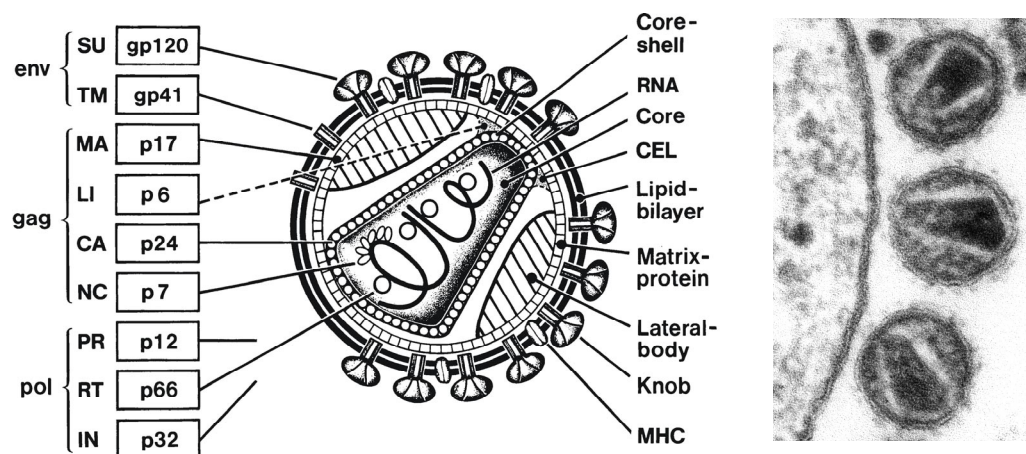
Lentivirusinfektionen verlaufen charakteristischerweise chronisch, zeigen eine lange klinische Latenzphase, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. HIV-1 und HIV-2 weisen elektronenmikroskopisch die gleiche Morphologie auf, unterscheiden sich aber im Molekulargewicht ihrer Proteine und der Anordnung der Regulatorgene. Hinsichtlich des klinischen Verlaufs ist gezeigt, dass HIV-2 *in vivo* zu niedrigeren Titern repliziert und der Krankheitsverlauf bei HIV-2 weniger rasch verläuft. Lethal sind beide Virustypen.

1.3.1 Morphologie

Lentiviren besitzen eine gemeinsame Grundstruktur (siehe Abbildung 1). Im Elektronenmikroskop ist in den 80 bis 100 nm großen Partikeln ein dichter, konischer Kernbereich (*core*) erkennbar, der durch das hydrophobe Capsid-Protein (CA, p24) gebildet wird und den Ribonukleinkomplex umhüllt (Gelderblom 1991). Dieser besteht aus zwei identischen RNA-Molekülen mit je einer gebundenen Primer-tRNA, der retroviralen Protease (PR), der Reversen Transkriptase (RT), der Integrase (IN) und einem kleinen phosphorylierten, basischen Nukleocapsidprotein (NC). Den Kernbereich umgibt eine Matrix bestehend aus dem Matrixprotein (MA, p17), das mit einer aminoterminalen Myristoylkette in der äußeren Virusmembran verankert ist.

Bei der Virusreifung werden zunächst virale Proteine in die Plasmamembran der Wirtszelle eingelagert und anschließend bei der Abknospung des Virus von der Wirtszelle wird die Plasmamembran mitgeführt (Earl *et al.* 1990, Gelderblom *et al.* 1987). Die Glycoproteine der Virushülle entstammen einem Vorläufermolekül (gp160), das eine zelluläre Protease im Golgi-Apparat in ein Transmembran- (TM, gp41) und ein nicht-kovalent assoziiertes Oberflächenprotein (SU, gp120) spaltet (McCune *et al.* 1988). Zusätzlich enthalten die Viruspartikel ein kleines Linkerprotein (LI), das das Capsid mit der Membran verbindet (Gelderblom 1991).

Abbildung 1: Schematischer Aufbau und elektronenmikroskopische Darstellung von HIV-1



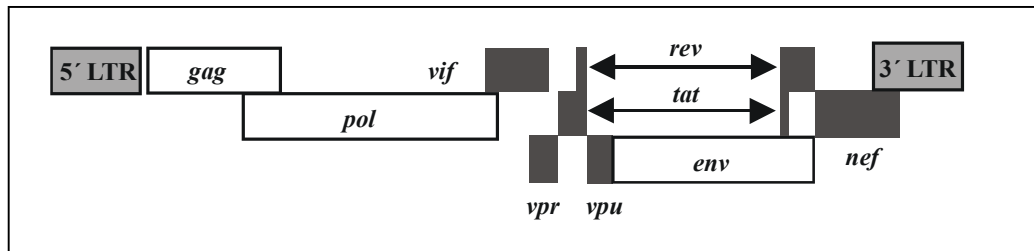
(mit freundlicher Genehmigung von Herrn. Prof. Dr. Gelderblom)

1.3.2 Organisation des viralen Genoms

Die meisten replikationskompetenten Retroviren benötigen im wesentlichen drei Gene: *gag* (*group antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*). Diese Gene werden von den LTR (*long terminal repeat*)-Regionen flankiert, die bei der Integration kovalent mit der chromosomalen DNA verknüpft werden. Die *gag*- und *env*-Gene codieren für die internen Strukturproteine bzw. die Glycoproteine der Virushülle, das *pol*-Gen für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Die ca. 9,5 kb lange RNA von HIV-1, die ein für eukaryontische mRNA typisches 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz trägt, enthält zusätzlich 6 Gene *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* und *nef*, die für regulatorische Proteine codieren (siehe

Abbildung 2). *Nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* werden auch als akzessorische Gene bezeichnet, da sie für die Replikation *in vitro* im Gegensatz zu *tat* und *rev* nicht erforderlich sind (Wong-Staal 1991).

Abbildung 2: Proviraies HIV-1 Genom



LTR (long terminal repeat)

Die LTR-Bereiche von HIV-1 sind zwei identische DNA Sequenzen mit einer Länge von ca. 600 Nukleotiden, die das provirale Genom an beiden Seiten flankieren. Diese nur in der proviralen DNA vollständig vorliegenden Sequenzen werden in die drei Bereiche U3 (*unique region* am 3'-Ende der RNA), R (*repeat region*) und U5 (*unique region* am 5'-Ende der RNA) unterteilt und beinhalten die für die Transkription von Retroviren charakteristischen Promotor- und Enhancerregionen (Rosen *et al.* 1985). Im Provirus befindet sich U3 am 5'-Terminus der proviralen LTR und enthält neben dem basalen Promotor für die zelluläre RNA-Polymerase II modulierende Elemente, wie z.B. Bindungsstellen für die zellulären Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nabel und Baltimore 1987) oder Sp-1 (Jones *et al.* 1986). Die stromabwärts der U3-Region liegende R-Region enthält eine „stem-loop“-Struktur (TAR, *tat response element*), die den viralen Transaktivator Tat bindet (Feng und Holland 1988). Außerdem hat sie eine entscheidende Bedeutung bei der Synthese der doppelsträngigen DNA während der Reversen Transkription.

Das 3'-Ende der LTR wird von der U5-Region gebildet, die in der genomischen RNA und allen gespleissten RNA-Spezies vorhanden ist (Pavlakakis *et al.* 1992). Obwohl beide LTR identisch sind, existieren spezielle retrovirale Kontrollmechanismen, die ausschließlich die Initiationssequenzen in der 5'-LTR und die Polyadenylierungssignale in der 3'-LTR verwenden (Cherrington und Ganem 1992, DeZazzo *et al.* 1992).

Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)

Zum Komplex der gruppenspezifischen Antigene des HIV gehören insgesamt 6 Proteine (p17=MA, p24=CA, p7=NC, p1, p2 und p6) die als gemeinsames Vorläuferprotein (55 kD) synthetisiert und von der viralen Protease im Verlauf der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten gespalten werden (Henderson *et al.* 1992). Das am Aminoterminus myristoylierte Matrixprotein (MA) ist verantwortlich für die Assoziation von Gag mit der Plasmamembran und damit für die Bildung infektiöser Virionen (Bryant und Ratner 1990). Die kegelförmige Kernhülle der Viruspartikel wird von dem Capsid-Protein (CA) gebildet, das essentiell für den Zusammenbau des Cores ist. Das basische Nucleocapsidprotein (NC) umhüllt die virale RNA. Es enthält zwei Zinkfinger motive (Cystein-Histidin-Motiv), die an eine spezifische Signalsequenz in der RNA, *psi* (*packaging site*), binden (Berkowitz und Goff 1994, Sakaguchi *et al.* 1993). P6 enthält Sequenzen, die für das Ablösen der frisch gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche verantwortlich sind (South *et al.* 1990, Bess *et al.* 1992). Die Funktionen der beiden Peptide p1 und p2 sind nicht bekannt.

Enzyme (*pol*-Genprodukte)

Das *pol*-Gen codiert für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Es verfügt über keinen eigenen Translationsstart, sondern wird als Fusionsprotein mit dem Gag-Protein (Gag/Pol-Vorläuferprotein, p160) translatiert. Voraussetzung für die Synthese des Gag/Pol-Fusionsproteins ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters (*frameshift*) in einer uridinreichen Region der mRNA während der Translation (Reil *et al.* 1993). Durch diese Leserasterverschiebung um -1 wird das Stopcodon zur Beendigung der Gag-Protein-Synthese überlesen und die Pol-Domänen werden angefügt. Dies findet bei etwa 5% der Translationsvorgänge statt, so dass das Mengenverhältnis Gag/Pol-Fusionsprodukte zu Gag-Proteinen etwa 5:95 beträgt. Die Gag/Pol-Fusionsproteine werden am Aminoterminus myristoyliert und sind über diese Modifikation mit der Plasmamembran assoziiert. Die Spaltung in die enzymatisch aktiven Einzelkomponenten durch die virale Protease erfolgt überwiegend erst bei der Virusreifung (Maturation) im bereits von der Zelloberfläche freigesetzten Partikel.

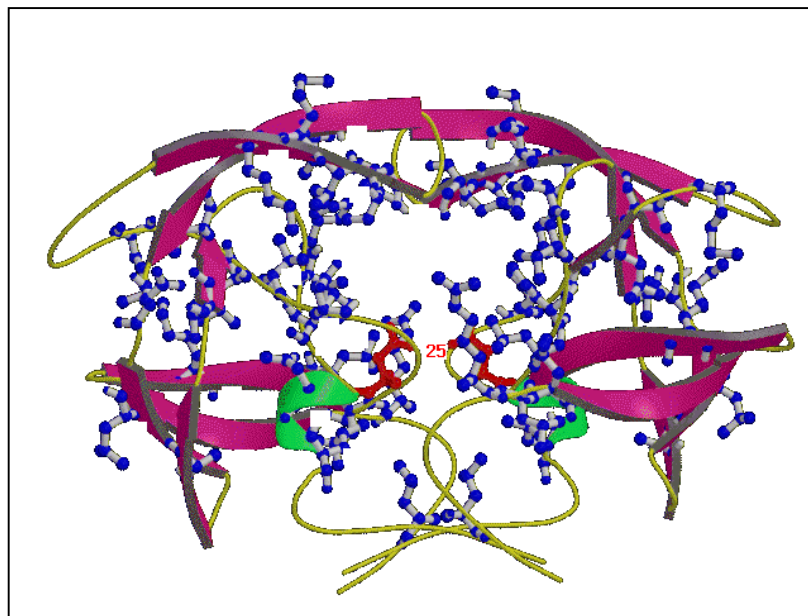
Protease

Die Proteolyse des Gag/Pol-Vorläuferproteins wird von der viruscodierten Protease durchgeführt. Das in dem Polyprotein enthaltene Enzym wird durch Autoproteolyse freigesetzt und prozessiert anschließend durch Hydrolyse weiterer Peptidbindungen des Fusionsproteins die virale Reverse Transkriptase und die Integrase, sowie die Gag-Vorläufer-Proteine in reife Gag-Proteine. Die Blockierung dieses Prozesses führt zu unreifen, nicht-infektiösen Viren da nur die maturierten Komponenten fähig sind intakte, infektiöse Viren zu bilden (von der Helm 1996, Crawford und Goff 1985).

Die HIV Protease enthält eine Asp-Thr-Gly-Sequenz (AS 25-27), die auf ihre Zugehörigkeit zu den Aspartatproteasen hinweist (Toh *et al.* 1985). Diese, auch als saure oder Carboxyproteasen bezeichneten Enzyme enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Wassermolekül, das von zwei Aspartat-Resten flankiert ist und zur Hydrolyse der Peptidbindung verwendet wird. Die Aspartat-Reste, von denen im aktiven Enzym einer in ionisierter Form vorliegt, aktivieren das Wassermolekül und fungieren als Protonenakzeptoren und -donoren. Sie befinden sich in den hochkonservierten Asp-Thr/Ser-Gly-Motiven separater Domänen, welche wahrscheinlich durch Genduplikation und anschließender Fusion zur Bildung einer einzelsträngigen Proteinase entstanden sind (Tang *et al.* 1978).

Die Aminosäuresequenz der HIV Protease ist sehr kurz (99 AS, 9-10 kd) und enthält nur einen Asp-Rest. Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass die retrovirale Protease ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten ist, deren Kontaktfläche das aktive Zentrum bildet (Lapatto *et al.* 1989, Navia *et al.* 1989, Wlodawer *et al.* 1989). Die beiden Untereinheiten des Dimers sind neben anderen Interaktionen durch ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das sowohl die Amino- als auch die Carboxytermini jeder Untereinheit enthält, verbunden. Zwischen den Untereinheiten befindet sich eine lange Spalte in der die Substratpolypeptide binden und sich die beiden katalytisch wichtigen Asp-Reste befinden.

Jede Untereinheit weist ein Segment auf (*flap*), das von einem antiparallelen β -Faltblatt mit einem β -turn gebildet wird und sich über die substratbindende Spalte ausdehnt (siehe Abbildung 3). Der Vergleich von Proteasestrukturen mit und ohne Inhibitor zeigte signifikante strukturelle Unterschiede bei der Substratbindung (Miller *et al.* 1989). Die größte Änderung erfolgt in der Lage des „*flap*“-Segmentes, welches sich um ca. 15 Å bewegt. Dadurch ist die Substratbindung und die Freisetzung der geschnittenen Produkte gewährleistet (Gustchina und Weber 1990).

Abbildung 3: Bändermodell der HIV-1 Protease

Das aktive Zentrum (Asp-25) ist rot dargestellt
 Quelle: <http://www.hiv-web.lanl.gov>

Reverse Transkriptase

Die Reverse Transkriptase (RT) katalysiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase den Einbau von Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) in einen (-)-DNA-Strang. Dabei verwendet sie die genomische HIV RNA als Matrize (Baltimore 1970). Außerdem enthält das Enzym eine RNase H-Aktivität, mit der es die Degradation der (+)-RNA von dem (-)-DNA-Strang katalysiert (Coffin 1990). Durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität der RT wird ein zweiter (+)-DNA-Strang generiert, so dass eine provirale doppelsträngige DNA entsteht (Varmus und Swanstrom 1991).

Das Enzym bildet ein Heterodimer aus zwei Proteinuntereinheiten mit Molekulargewichten von 66 kD und 51 kD. Der kleineren Untereinheit (p51) fehlt durch proteolytische Abspaltung von 120 Aminosäuren des Carboxyterminus die RNaseH-Aktivität. Im aminoterminalen Bereich ist sie mit der großen Untereinheit (p66) identisch (siehe Abbildung 4).

Anfang der neunziger Jahre wurde die Kristallstruktur der RT im Komplex mit dem Inhibitor Nevirapin ermittelt (Kohlstaedt *et al.* 1992a, Smerdon *et al.* 1994). Kurze Zeit später wurden Strukturanalysen einer RT angefertigt, die an ein doppelsträngiges 18/19-mer DNA-Oligonukleotid gebunden und mit einem Fab-Teil eines Antikörpers komplexiert war

(RT-DNA-Cokristall) (Jacobo-Molina und Arnold 1991, Jacobo-Molina *et al.* 1993, Arnold *et al.* 1992). Inzwischen existieren drei Strukturen des Enzyms ohne Liganden (Esnouf *et al.* 1995, Rodgers *et al.* 1995, Hsiou *et al.* 1996) und mehrere zusätzliche RT-Strukturen in Verbindung mit Inhibitoren (Ding *et al.* 1995, Ren *et al.* 1995). Die Struktur der Polymerase gleicht einer rechten Hand, in der die Regionen der Untereinheiten p51 und p66 als Finger, innere Handfläche, Daumen und Handgelenk bezeichnet werden (siehe Abbildung 4; Kohlstaedt *et al.* 1992b).

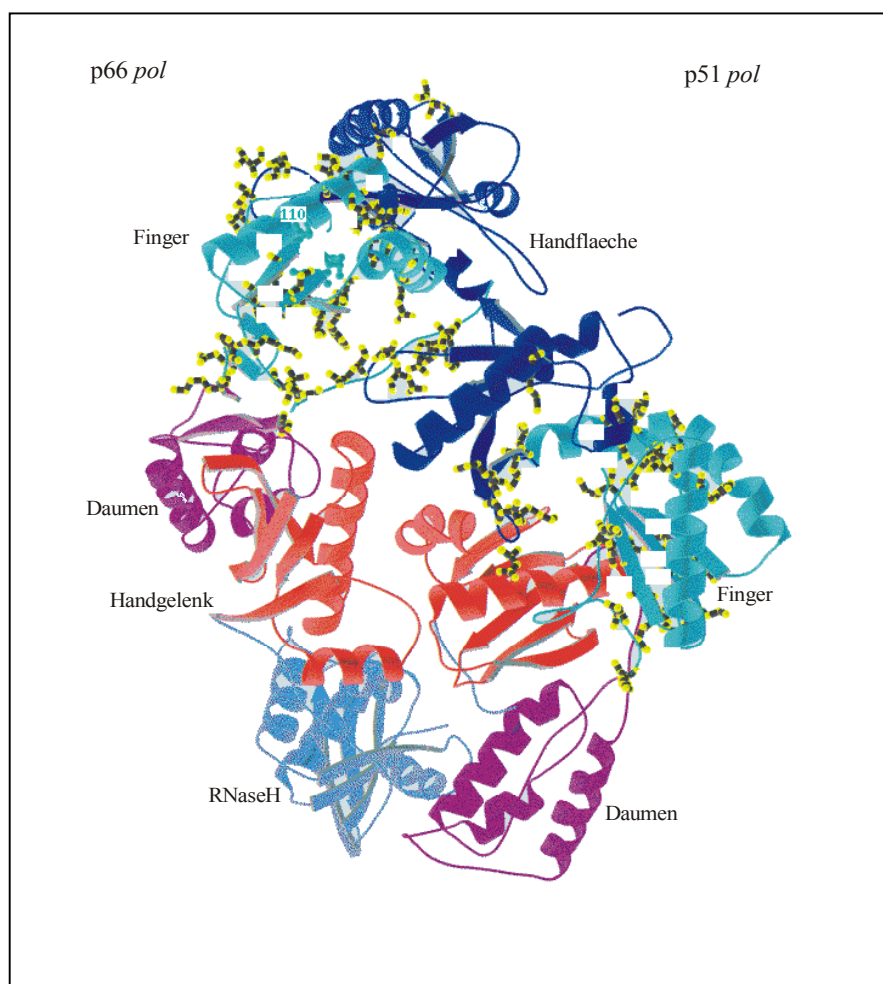
In der Region, die der inneren Handfläche der großen Untereinheit entspricht, liegt das aktive Zentrum, in dem zwei konservierte Aspartat-Reste (Asp-185, Asp-186) eines YXDD-Motivs an einen dritten Aspartat-Rest (Asp-110) angrenzen. Bei der Transkription der RNA in DNA verbinden zwei zweiwertige Metallionen diese konservierten Aminosäurereste und die Phosphate der Nukleotide in einem Chelat-Komplex und vermitteln so den nukleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe des „Primers“ und die darauf folgende Freisetzung von Pyrophosphat, dessen anschließende Hydrolyse die Reaktion vorantreibt (Steitz und Steitz 1993, Pelletier *et al.* 1994, Patel *et al.* 1995).

Obwohl die Aminosäuresequenz von p51 identisch mit dem entsprechenden aminoterminalen Abschnitt von p66 ist, unterscheidet sich die Struktur der beiden Untereinheiten. Im Vergleich zu den Abschnitten in p66 ist die, dem Handgelenk entsprechende Region der p51-Untereinheit, so gedreht, dass sie die in der Innenfläche lokalisierten drei Asp-Reste des aktiven Zentrums abdeckt und die dem Daumen zugeordnete Region versetzt ist. Dadurch ist nur die p66-Untereinheit an der Polymerase-Aktivität des RT Heterodimers beteiligt (Le Grice *et al.* 1991, Hostomsky *et al.* 1992). Die p51-Untereinheit der HIV-1 RT hat eine strukturelle Rolle innerhalb des p51/p66-Heterodimers und könnte in die Bindung des tRNA-„Primers“ involviert sein. Die dem Handgelenk zugeordnete Region der p66-Untereinheit überbrückt den Abschnitt zwischen der Polymerase- und der RNaseH-Aktivität und ist an wichtigen Interaktionen zwischen der kleinen und der großen Untereinheit beteiligt.

Der Vergleich der Struktur von HIV-RT ohne Liganden mit der Struktur eines RT-DNA-Komplexes zeigt die Flexibilität des Daumens der p66-Untereinheit. In nicht-komplexierter RT befindet sich die Spitze der „Daumen-Region“ in der Nähe der den Fingerspitzen entsprechende Region. Bindet die RT eine Nukleinsäure bewegt sich die „Daumen-Region“ der großen Untereinheit um 30° von ihrer ursprünglichen Position fort. Diese Mobilität scheint eine konservierte Eigenschaft von Polymerasen zu sein (Sousa *et al.* 1994). Darüber hinaus wurden weitere kleinere Strukturänderungen durch Bindung des „primer templates“ in anderen Abschnitten der RT beobachtet. Das aktive Zentrum jedoch wird durch die Bindung von DNA nicht verändert.

Morphologische und biochemische Untersuchungen zeigten, dass die DNA Polymerase- und die RNaseH-Aktivität gleichzeitig auf das „*primer template*“ einwirken (Wöhrl und Mölling 1990, Furfine und Reardon 1991, Kohlstaedt *et al.* 1992b, Jacobo-Molina *et al.* 1993). Dabei liegt die DNA-Helix in der Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase in der A-Form vor, während sie in Nähe der RNaseH-Aktivität die B-Form einnimmt. Zwischen diesen beiden Segmenten liegt eine Krümmung der DNA-Helix von 40-45° vor, die eine räumliche Trennung der doppelsträngigen DNA und der RNaseH-Aktivität bewirkt.

Abbildung 4: Bändermodell der HIV-1 Reversen Transkriptase



Quelle: <http://www.hiv-web.lanl.gov>

Integrase

Die am 3'-Ende des *pol*-Leserahmens codierte Integrase wirkt sowohl als Endonuklease als auch als Ligase. Das 32 kDa große Enzym ist zusammen mit der Reversen Transkriptase, dem Matrixprotein (MA) sowie dem Vpr-Protein Bestandteil des Präintegrationskomplexes (Farnet und Haseltine 1991). Durch die im MA- und im Vpr-Protein enthaltenen Kernlokalisationssignale wird der Präintegrationskomplex unter ATP-Verbrauch in den Zellkern transportiert (Bukrinsky *et al.* 1992, Gallay *et al.* 1995, Heinzinger *et al.* 1994). Dort entfernt die Integrase je zwei Nukleotide an den beiden 3'-Enden der proviralen DNA. Die dadurch entstehenden freien 3'-OH-Gruppen greifen als nukleophile Gruppen gleichzeitig die Phosphodiesterbindungen der zellulären DNA an, so dass es zu einer direkten Veresterung mit der Wirts-DNA kommt („Strang Transfer Reaktion“, Brown *et al.* 1989). Die verbleibenden Strangbrüche zwischen den 5'-Enden der viralen DNA und den 3'-Enden der Wirts-DNA werden von Reparatursystemen der Wirtszelle geschlossen.

Membranproteine (*env*-Genprodukte)

Das *env*-Gen (*envelope*) codiert für das Transmembran- (TM, gp41) und das Oberflächenprotein (SU, gp120) des viralen Hüllproteins. Es wird als Vorläuferprotein translatiert (gp160), im Golgi-Apparat glykosiliert und postrational von einer zellulären Protease geschnitten, wobei die beiden Untereinheiten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen aneinander gebunden bleiben. Den extrazellulären Teil des TM gp41 bilden die Leucin-Zipper-ähnliche Region und das für die Infektion notwendige „Fusions-Peptid“. SU enthält die Bindungsstelle für den CD4-Rezeptor und den Co-Rezeptor (Lasky *et al.* 1987), sowie die wichtigsten antigenen Determinanten für neutralisierende Antikörper (Javaherian *et al.* 1989).

Transaktivatoren (Tat und Rev)

Tat (*transactivator*, 9 bis 14 kd abhängig vom Isolat) und **Rev** (*regulator of viral expression*, 13kd) sind regulatorische Proteine, die im Zellkern akkumulieren und an spezifische Sequenzen der proviralen DNA binden. Beide Proteine sind essentiell für die Vermehrung von HIV *in vitro*. Tat bindet an das in der LTR lokalisierte „*tat responsive element*“ (TAR), wodurch sich die Menge viraler kompletter Transkripte in der Zelle drastisch erhöht.

Das **Rev**-Protein bindet die genomische virale RNA an einer „*rev-responsive element*“ (RRE) genannten Sequenz, die im *env* lokalisiert ist. Durch diese Bindung verhindert Rev wahrscheinlich das Binden von Spleissfaktoren und/oder bewirkt eine direkte Ankopplung an einen zellulären Transportmechanismus vom Zellkern in das Zytoplasma. Auf diese Weise reguliert Rev die virale Genexpression, indem es das Gleichgewicht von mehrfach gespleissten mRNA, die für regulatorische Proteine codieren zu für Strukturproteine und Enzyme codierende einfach und nicht gespleisste mRNA verschiebt (Cullen 1991).

Akzessorische Proteine

Das lentivirale **vif**-Gen (*viral infectivity factor*) codiert für ein stark konserviertes Protein (23kD), das für die effektive Reifung der Virionen nach dem Verlassen der Zelle notwendig zu sein scheint. Vif wurde in geringen Mengen in Viruspartikeln detektiert (Karczewski und Strebel 1996) und ist durch Interaktionen carboxyterminaler basischer Regionen mit den Membranen infizierter Zellen assoziiert (Guy *et al.* 1991, Michaels *et al.* 1993, Goncalves *et al.* 1994 und 1995). Vif-defekte HIV-1 Stämme sind ca. 1000fach weniger infektiös, als der Wildtyp (Fisher *et al.* 1987).

Das **Vpr**-Protein (*viral protein R*, 11-15 kd) interagiert mit dem Link-Protein p6 im carboxy-terminalen Bereich des Gag-Vorläuferproteins und wird in die entstehenden Viruspartikel eingebaut (Lu *et al.* 1993, Paxton *et al.* 1993, Lavalley *et al.* 1994). Es wurde in Assoziation mit dem Präintegrationskomplex des HIV-1 nachgewiesen und trägt ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) (Heinzinger *et al.* 1994). Dies deutet auf eine Beteiligung des Vpr am Transport des Präintegrationskomplexes zum Nukleus hin. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von Vpr entweder allein oder im Kontext der HIV-Replikation den Zellzyklus in G2/M arretiert (Rogel *et al.* 1995, He *et al.* 1995, Jowett *et al.* 1995). Obwohl noch Unklarheit über den Nutzen dieser Eigenschaft besteht, ist es denkbar, dass durch den Arrest die virale Produktion optimiert oder die Apoptose der Zelle blockiert wird.

Das **vpu**-Gen codiert ein kleines ca. 80 Aminosäuren langes, phosphoryliertes Protein (Vpu, *viral protein unknown*) und hat im Gegensatz zu allen anderen HIV-1 Genen kein Homologes im Genom des HIV-2 (Cohen *et al.* 1988). Es verfügt über hydrophobe Aminosäurefolgen, über die es in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingelagert wird. Das Vpu verhindert die Komplexbildung des neusynthetisierten gp160 mit dem CD4-Protein im Bereich des ER und des Golgi-Apparates, so dass CD4 degradiert und seine Oberflächen-

expression verhindert wird (Willey *et al.* 1992). Eine weitere Funktion von Vpu ist der effiziente Transport der Virionen aus der Zelle (Klimkait *et al.* 1990, Terwilliger *et al.* 1989).

Der Leserahmen des Nef-Proteins (25-27 kD, *negative factor*) liegt zwischen dem *env*-Gen und der 3'-LTR mit deren U3-Region er überlappt. Das Protein, das früh im Replikationszyklus produziert wird, induziert in den infizierten Zellen eine schnelle Herabregulierung von CD4 und MHC-Klasse-I-Antigenen durch Endocytose (Aiken *et al.* 1994, Collins *et al.* 1998). Das ist einer der Mechanismen von HIV, durch die Superinfektion verhindert, die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen gestört und ein „Entkommen“ vor dem Angriff zytotoxischer T-Zellen begünstigt wird (Harris 1999).

1.3.3 Replikation von HIV-1

Rezeptoren

Die Infektion erfordert die spezifische Bindung des viralen Oberflächenproteins SU (gp120, siehe Kapitel 1.3.2) an das CD4-Molekül der Zielzelle, dem primären und notwendigen Rezeptor von HIV (Dalglish *et al.* 1984, Klatzmann *et al.* 1984, McDougal *et al.* 1986).

Der CD4-Rezeptor (CD=*cluster of differentiation*) befindet sich auf CD4⁺-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Gliazellen und ist der natürliche Ligand für MHC-Klasse II Moleküle (Doyle und Strominger 1987). Er ist ein integrales Membranprotein mit vier immunoglobulinähnlichen, extrazellulären Domänen an dessen zytoplasmatischen Carboxyterminus die für die T-Zell-Signalübertragung notwendige Tyrosinkinase p56^{lck} gebunden ist (Leahy *et al.* 1992). Untersuchungen an CD4 exprimierenden murinen Fibroblasten zeigten, dass für eine effektive HIV-Infektion mindestens ein weiterer Zelloberflächenfaktor notwendig ist (Maddon *et al.* 1986).

Die Chemokinrezeptoren wurden kurze Zeit später als diese zellulären Kofaktoren charakterisiert (Alkhatib *et al.* 1996, Choe *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996, Doranz *et al.* 1996, Dragic *et al.* 1996, Feng *et al.* 1996). Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Zu den strukturellen Gemeinsamkeiten aller GPCR gehören sieben -helikale Transmembrandomänen, die durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, sowie der extrazelluläre Aminoterminus (N-Terminus) und der intrazelluläre Carboxyterminus (C-Terminus) (Horuk 1994). Chemokine (*chemo-attractant cytokines*) werden nach ihrem Cystein-Motiv in die drei

Gruppen C, C-C (β -Chemokine) und C-X-C (α -Chemokine) unterteilt. Die Spezifität der Rezeptoren für die Chemokine wird durch den N-Terminus und einzelne Aminosäuren in den extrazellulären Loops bestimmt (Premack und Schall 1996).

Die beiden für den Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle wichtigsten Korezeptoren sind CXCR4 (Endres *et al.* 1996, Feng *et al.* 1996) und CCR5 (Alkhatib *et al.* 1996, Choe *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996, Doranz *et al.* 1996, Dragic *et al.* 1996). CXCR4 ist der natürliche Rezeptor für das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*, Bleul *et al.* 1996, Oberlin *et al.* 1996), während CCR5 als Rezeptor sowohl für MIP-1 α und MIP-1 β (*macrophage inhibitory protein*) als auch für RANTES (*regulated upon activation T-cell expressed and secreted*) dient (Murphy 1996). Diese Chemokine sind in der Lage Zellen vor einer HIV-1 Infektion zu schützen (Bleul *et al.* 1996, Oberlin *et al.* 1996).

Andere Chemokinrezeptoren, wie zum Beispiel CCR2b und CCR3 ermöglichen ebenfalls eine Infektion durch einige Virusstämme. CCR3 könnte neben CCR5 zumindestens *in vitro* eine Rolle bei der Infektion von Mikroglia-Zellen spielen (He *et al.* 1997).

Fusion des Virus mit der Zelle

Die Bindung des viralen Oberflächenproteins Env an den zellulären CD4-Rezeptor induziert Konformationsänderungen in der gp120-Untereinheit, die durch Freilegung vorher verdeckter Epitope die Bindung an den Chemokinrezeptor mit nachfolgender Membranfusion an der Zelloberfläche ermöglichen (Doms und Peiper 1997). Nach dem „Abstreifen der Membran“ (*uncoating*) befindet sich der mit dem Capsid und einem Teil der Matrixproteine assoziierte Nukleoproteinkomplex im Zytoplasma der Wirtszelle (Bukrinsky *et al.* 1993, Bowerman *et al.* 1989, Farnet und Haseltine 1991).

Reverse Transkription und Integration

Die Reverse Transkriptase (RT, siehe Kapitel 1.3.2) beginnt mit der DNA-Synthese an der Primerbindungsstelle (PBS) im 5'-Bereich der genomischen RNA. Als Primer verwendet sie dafür eine Lysin-tRNA, deren Sequenz am 3'-Ende komplementär zur Primerbindungsstelle ist. Ausgehend von dieser tRNA synthetisiert die RT in 5' \rightarrow 3'-Richtung einen zu den U5- und R-Sequenzen komplementären DNA-Strang. Die mit der Reversen Transkriptase assoziierte RNaseH-Funktion hydrolysiert den RNA-Anteil aus dem RNA/DNA-Hybrid.

Hierdurch liegt nun ein DNA-Einzelstrang vor, der die U5- und R-Sequenzen enthält und kovalent mit dem 3'-Ende der tRNA verknüpft ist. Dieses Molekül wird an das 3'-Ende der genomischen RNA transloziert und dient nach Hybridisierung mit der vorliegenden R-Region als Primer des zum RNA-Genom komplementären DNA-Stranges. Der RNA-Anteil des gebildeten Hybrids wird bis auf zwei purinreiche Bereiche von der RNaseH hydrolisiert. Diese kurzen RNA-Folgen des Polypurintraktes befindet sich zum einen neben der 3'-U3-Region (PPT, *polypurine tract*) und am Ende des *pol*-Genes (cPPT, *central PPT*, Charneau *et al.* 1992, Pullen und Champoux 1990). Ausgehend vom PPT wird die (+)-DNA bis zum Ende des (-)-Stranges, der Primer-tRNA, synthetisiert und anschließend an das 3'-Ende der (-)-DNA transloziert, wo eine Hybridisierung der Primerbindungsstellen stattfindet. Die fortgesetzte Synthese endet an einem zentralen Terminationssignal (CTS, *central termination signal*) und verdrängt dabei etwa 100 Nukleotide des zuvor ebenfalls bis zum Ende des (-)-Stranges verlängerten cPPT (Charneau *et al.* 1994). Zelluläre Enzyme sind wahrscheinlich für die Entfernung dieses Überhangs und das Schließen der (+)-DNA verantwortlich. Die restliche RNA (Primer-tRNA und PPT) wird von der RNaseH hydrolisiert und die Reverse Transkriptase vervollständigt beide DNA-Stränge, so dass das Virusgenom als doppelsträngige DNA, in der die codierenden Sequenzen von identischen LTR-Regionen flankiert werden, vorliegt (Karageorgos *et al.* 1995).

Da die Reverse Transkriptase die Lesegenauigkeit nicht überprüfen kann, werden bei der Synthese der beiden DNA-Stränge mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsch gepaarte Basen eingebaut, das heißt durchschnittlich entsteht pro Replikationsrunde in jedem Genom ca. 1 Mutation (Preston *et al.* 1988). Obwohl viele dieser spontan entstehenden Mutationen zu replikationsinkompetenten Viren führen, entstehen doch replikationskompetente, vom Immunsystem nicht erkannte Varianten, so dass sich *in vivo* nach mehreren Infektionszyklen eine Vielzahl von nahe verwandten, aber genetisch unterschiedlichen HIV-Varianten heranbildet, die als „Quasispezies“ bezeichnet werden.

Das in eine doppelsträngige DNA transkribierte Virusgenom bleibt mit den Capsidkomponenten verbunden und wird als Präintegrationskomplex mit ihnen in den Zellkern transportiert, wo es mit Hilfe der viralen Integrase kovalent in das Wirtsgenom integriert wird. Dieses stabil integrierte Provirus bleibt in der Zelle erhalten und wird bei ihrer Teilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Bildung und Reifung neuer Viruspartikel

Die Partikelvermehrung beginnt mit der Transkription der viralen RNA vom Provirus durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II. Die Transkription wird durch die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκ-B, die nach der Aktivierung der Zelle durch Mitogene oder Zytokine induziert und in den Zellkern transportiert wurden, an ihre Bindungsstellen in der HIV-LTR initiiert. Diese initiale frühe Transkription führt zu einer frühen Synthese von regulatorischen HIV-Proteinen wie z.B. Tat oder Rev. Tat wiederum bindet an TAR und stimuliert dadurch die weitere Transkription, insbesondere die Ausbildung langer RNA-Transkripte. Die vollständigen HIV-Transkripte enthalten ein 5'-Cap und ein Poly-A-Ende und dienen sowohl als genomische RNA der neuen Virionen, als auch als mRNA für die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine. Außerdem entstehen aus ihnen nach Erreichen einer Schwellkonzentration von Rev mehr als 30 alternativ gespleisste mRNA, von denen die Env-Glycoproteine und die regulatorischen (akzessorischen) Proteine translatiert werden (Neumann *et al.* 1994, Pavlakis *et al.* 1992).

Die Synthese der viralen Proteine findet mit Ausnahme der Glycoproteine an freien Ribosomen im Zytoplasma statt. Env wird an Polyribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums translatiert, über die hydrophobe Region im carboxyterminalen Bereich in der ER-Membran verankert, an den Asparaginresten glykosiliert und im Verlauf des Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche von einer zellulären Protease in den externen (gp120) und den membranverankerten Proteinanteil (gp41) prozessiert. Die Glycoproteine befinden sich auf den Oberflächen infizierter Zellen und entfalten hier ihre fusogene Wirkung, indem sie sich an die CD4-Rezeptoren nicht infizierter Zellen binden und die Verschmelzung der Membranen induzieren. Auf diese Weise kann sich das Virus partikelunabhängig im Organismus verbreiten.

Der Zusammenbau der Viruspartikel findet an Plasmamembranen statt. Es bilden sich zunächst halbmondförmige Strukturen, die sich dann zu einer membranumhüllten Kugel schließen und von der Zelle ablösen. Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes aus genomischer RNA und tRNA^{Lys}, Gag- und Gag/Pol-Polyproteinen an der Zellmembran (Gelderblom 1991). Dabei interagieren vermutlich die RNA und NC (Berkowitz und Goff 1994) sowie TM und MA (Dorfman *et al.* 1994, Yu *et al.* 1992) um den Einbau aller notwendigen Proteine in die entstehenden Partikel zu gewährleisten.

Die HIV-Protease wird erst während der Knospung der HIV-Partikel von der Zelle (*budding*) aktiviert, so dass die Vorläuferproteine nicht schon im Zytoplasma gespalten werden. Die beim „*budding*“ von der Wirtszelle erworbene Lipidhülle des Virus zeigt gegenüber der Plasmamembran eine Anreicherung bestimmter Phospholipide und Cholesterol. Auch

zelluläre Proteine werden selektiv integriert (Arthur *et al.* 1992, Franke *et al.* 1994), so dass die Viren nicht vom wirtseigenen Komplementsystem erkannt und zerstört werden (Kinoshita 1991).

Der Ort des „buddings“ kann je nach Zelltyp unterschiedlich sein. In Monozyten und Makrophagen wird HIV oft in zytoplasmatische Membransysteme hinein gebildet und häuft sich so in Vakuolen an. T-Zellen hingegen zeigen *in vivo* und *in vitro* ein Virusassembly an der Zelloberfläche, so dass die Viren direkt in den Extrazellularraum abgegeben werden (Orenstein *et al.* 1988, Gendelman *et al.* 1989).

1.4 Antiretrovirale Therapie der HIV Infektion

1.4.1 Ziele antiretroviraler Therapie

Zur Therapie von HIV-Infektionen stehen derzeit Medikamente aus vier Wirkstoffklassen zur Verfügung, die zwei für die Virusvermehrung unverzichtbare Enzyme inhibieren: die für die Replikation benötigte Reverse Transkriptase (RT) und die für die Maturation der viralen Proteine zuständige virale Protease (siehe Kapitel 1.3.2).

Mit diesen und allen künftigen antiretroviralen Medikamenten ist jedoch eine Eradikation von HIV und damit eine Heilung der HIV-Infektion allein nicht möglich, da die provirale DNA in das Genom ruhender Lymphozyten integriert werden kann (siehe Kapitel 1.3.3). Die Aktivierung dieser Zellen bewirkt eine erneute Virusproduktion. Eine Eradikation könnte erst dann gelingen, wenn mit der antiretroviralen Therapie eine Aktivierung der ruhenden infizierten Lymphozyten gelänge und damit dieses Reservoir zerstört werden könnte, ohne dass gleichzeitig neue Zielzellen infiziert werden.

Die frühen Ziele der antiretroviralen Therapie, die auf eine Viruseradikation zielten (*hit hard and early*) weichen deshalb einer Strategie der möglichst langfristigen Repression der Virusreplikation unter Berücksichtigung individueller Gegebenheiten (*hit adequately and individually*, Henry 2000, Carpenter *et al.* 2000). Mit den heute vorhandenen therapeutischen Mitteln ist es möglich, die Virusvermehrung weitgehend zu unterdrücken und damit die Viruslast im Plasma zu senken, deren Höhe nach der initialen Immunantwort als prognostischer Parameter für den weiteren Krankheitsverlauf gilt. Es kann eine Rückbildung HIV-bedingter Symptome sowie eine klinisch relevante Immunrestitution erzielt werden. Außerdem kann das noch bestehende CD4-Zellrepertoire, die Lymphknotenarchitektur und bei

Therapie der primären HIV-Infektion die HIV-spezifische Immunkompetenz erhalten werden. Durch antiretrovirale Therapien kann darüber hinaus die klinische Progression verhindert werden, so dass mit ihrer Einführung die HIV-assoziierte Mortalität und Morbidität drastisch gesenkt werden konnte, wodurch sowohl die Lebenserwartung als auch die Lebensqualität HIV Infizierter gesteigert werden konnte (Rockstroh 1999, Götz 1999).

1.4.2 Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI)

Nukleotidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)

Die nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) AZT, 3TC, ddC, ddI, d4T, ABC sind Didesoxynukleoside (siehe Anhang), die, nachdem sie von zellulären Kinasen durch Triphosphorylierung in ihre aktive Form überführt wurden (Desoxynukleotid-Triphosphate, dNTP), von der Reversen Transkriptase (RT) als Substrat bei der Transkription der viralen RNA in DNA erkannt werden (Furman *et al.* 1986). Ihre virusstatische Wirkung beruht zum einen auf der kompetitiven Hemmung der RT, zum anderen auf dem Kettenabbruch bei der Synthese der proviralen DNA durch ihren Einbau anstelle der entsprechenden natürlichen Nukleotide. Dieser Kettenabbruch wird durch eine Modifikation der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose erreicht (siehe Anhang).

Azidothymidin (AZT, Zidovudin, Retrovir[®]) wurde in Deutschland 1987 als erste antiretrovirale Substanz zur HIV-Therapie zugelassen. Es war das erste Medikament mit dem eine Inhibierung der HIV-Replikation *in vitro* und eine Reduzierung der Viruslast *in vivo* erzielt wurde (Mitsuya *et al.* 1985, Semple *et al.* 1991). Klinische Studien zeigten, dass mit einer AZT-Monotherapie im Spätstadium der Erkrankung die Häufigkeit opportunistischer Infektionen und die Mortalität gesenkt werden kann (Mitsuya und Broder 1987, Fischl *et al.* 1990, Volberding *et al.* 1990).

AZT ist in seiner aktiven Form ein Thymidinanalogon, an dessen 3'-Position der Desoxyribose die für den nukleophilen Angriff notwendige OH-Gruppe durch eine Azido-Gruppe ersetzt ist, so dass die bei der Reversen Transkription entstehende DNA-Kette beim Einbau dieses Moleküls abbricht und die Synthese der proviralen DNA mit anschließender Integration in das Wirtsgenom nicht stattfindet. Hierdurch wird der Infektionszyklus (siehe Kapitel 1.3.3) schon in einem sehr frühen Stadium abgebrochen. Die Affinität des triphosphorylierten Azidothymidins zur Reversen Transkriptase ist einhundertmal höher als zu den zellulären DNA-Polymerasen α und β (Modrow und Falke 1998).

Bei Didesoxythymidin (**d4T**, Stavudin, Zerit[®]) handelt es sich nach Phosphorylierung durch zelleigene Kinasen ebenfalls um ein Thymidinanalogon, dem die funktionelle Gruppe an 3'-Position des ehemaligen Desoxyribose rings fehlt (Baba *et al.* 1987, Lin *et al.* 1987).

Didesoxycytidin (**ddC**, Zalcitabin, Hivid[®]) wirkt ähnlich wie AZT, jedoch als Cytidinanalogon.

3TC (Lamivudin, Epivir[®]) ist als Cytidinanalogon seit seiner Zulassung 1996 ein in Kombinationstherapien wichtiger Bestandteil und wird auch zur Behandlung von Hepatitis B-Infektionen eingesetzt. In diesem Molekül wurde das 3'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose durch ein Schwefel-Atom ersetzt und der entstehende Desoxyribose ring befindet sich in L-Konfiguration (Loveday 2001).

Didesoxyinosin (**ddI**, Didanosin, Videx[®]) wirkt nach Aminierung zu Didesoxyadenosin und Triphosphorylierung als Adeninanalogon (Mitsuya *et al.* 1985).

Abacavir (**ABC**, Ziagen[®]), das nur in Kombination mit anderen antiretroviralen Medikamenten eingesetzt wird, wirkt in seiner aktiven Form als karbozyklisches Guaninanalogon.

Nukleotidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NtRTI)

Nucleotidanaloga unterscheiden sich von Nucleosidanaloga durch eine bereits gebundene Phosphatgruppe. Das einzige aus dieser Gruppe erst kürzlich (Oktober 2001) in den USA und im Februar 2002 in Deutschland zugelassene Medikament Tenofovir DF (Disoproxil Fumarat) ist ein Adeninphosphonatanalogon (siehe Anhang), das durch endogene Enzyme in den aktiven Metaboliten Tenofovirdiphosphat überführt wird.

Nicht-Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)

Die NNRTI DLV, EFV und NVP (siehe Anhang) sind hochspezifisch für die Reverse Transkriptase von HIV-1 und binden diese in der Nähe des aktiven Zentrums (Tantillo *et al.* 1994) in einer hydrophoben Seitentasche (*nonnucleoside inhibitor-binding pocket*, NNIBP) der großen Untereinheit. Die NNIBP ist nicht nur räumlich, sondern auch funktionell mit dem aktiven Zentrum der HIV-1 RT assoziiert (Debyser *et al.* 1992, Dueweke *et al.* 1992), so dass durch die kooperative Interaktion dieser beiden Regionen die Effektivität von NRTI und NNRTI in Kombinationstherapien gesteigert werden kann (Spence *et al.* 1995). Die Bindung

der NNRTI an die Aminosäuren (AS) 100 bis 110 und AS 180 bis 190 umfassenden α -Faltblätter bewirkt eine Umpositionierung eines dreisträngigen β -Faltblattes in der großen Untereinheit (p66) des dimeren Enzyms, so dass seine Inhibition durch Fixierung des aktiven Zentrums (AS 110, 185 und 186 der p66-UE) in einer inaktiven Konformation begründet ist (Kohlstaedt *et al.* 1992a, Esnouf *et al.* 1995). Im Gegensatz zu den NRTI benötigen diese Inhibitoren keine metabolische Aktivierung.

Nevirapin (NVP, Viramune[®]), das 1996 erste zugelassene Medikament dieser Wirkstoffklasse fungiert als π -Elektronen Donor für die die Bindungstasche umgebenden aromatischen Aminosäuren (Kroeger Smith *et al.* 1995).

Die Bindung des Wirkstoffs **Delavirdin** (DLV, Rescriptor[®]) an die RT wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindung an das an AS Position 103 der Hauptkette lokalisierte Lysin und hydrophoben Wechselwirkungen mit Prolin-236 stabilisiert. Der seit März 1997 in den USA zugelassene Wirkstoff ist in Deutschland jedoch nur über internationale Apotheken erhältlich.

Efavirenz (EFV, Sustiva[®]) gehört zur Gruppe der Benzoxazinone und ist seit 1999 in Europa zur Therapie von HIV-Infektionen zugelassen.

1.4.3 Proteaseinhibitoren (PI)

Die Proteaseinhibitoren greifen in der letzten Phase des Vermehrungszyklus ein, indem sie durch kompetitive Hemmung der viralen Protease die Reifung von Viruspartikeln zu infektiösen Viren verhindern (siehe Kapitel 1.3.3). PI sind hydrophob und ihre Wirksamkeit hängt von ihrer Bindung an humane Serumproteine ab (Molla *et al.* 1998). Aufgrund ihrer Struktur sind sie in der Lage, das aktive Zentrum des Enzyms zu binden. Die ersten PI basierten auf der Nachahmung des Konzepts des Übergangstadiums, in dem eine Phenylalanin-Prolin-Schnittstelle die kritische Peptidbindung bildet (Roberts *et al.* 1990). Das Übergangsstadium von Reaktionen, die von Aspartat-Proteasen katalysiert werden, ist gekennzeichnet durch die Addition eines Wassermoleküls an die zu hydrolysierende Peptidbindung. Eine Hydroxylgruppe im Inhibitor erstreckt sich über die Bindungsstelle und die Asp-Reste des aktiven Zentrums der Protease und ersetzt durch Interaktion mit diesen AS-Resten das von ihnen koordinierte Wassermolekül. Flankierende hydrophobe Seitenketten zur Nachahmung der P1/P1' und P2/P2' Seitenketten von Peptidsubstraten stellen die Grundstruktur einer Anzahl von Proteaseinhibitoren dar (**IDV**: Vacca *et al.* 1994; **RTV**: Kempf *et al.* 1995; **NFV**: Patick *et al.* 1996, **SQV**: Craig *et al.* 1991, **APV**: Tyndall *et al.*

2000). Obwohl sich diese substratähnlichen Substanzen in ihrer chemischen Struktur stark voneinander unterscheiden (siehe Anhang), nehmen sie in der substratbindenden Spalte der HIV-Protease eine sehr ähnliche räumliche Struktur ein.

Zusätzlich zu den peptidähnlichen PI wurden basierend auf Protein-Struktur-Techniken (*Drug-Design*), die sich auf schrittweise kristallografische Analysen stützten, weitere nicht-peptidische entwickelt (Appelt *et al.* 1991). Von diesen Substanzen wurde jedoch bisher noch keine zur Therapie von HIV-Infektionen zugelassen.

1.4.4 Kombination der antiretroviralen Substanzen (HAART)

Die klinische Studie ACTG-175 (AIDS Clinical Trials Group) bzw. Delta-Studie zeigte 1995 die eindeutige Überlegenheit einer Kombinationstherapie bestehend aus zwei Nukleosidanaloga (eines davon auf jeden Fall AZT) im Vergleich zur Monotherapie (Delta Coordinating Committee 1996, Hammer *et al.* 1996). Mit der Einführung der Proteaseinhibitoren 1996 ergaben sich weitere Möglichkeiten antiretroviraler Kombinationstherapien. In Placebo-kontrollierten klinischen Studien wurde gezeigt, dass sich die Mortalitätsrate verringert und die Anzahl der AIDS-definierten Ereignisse abnimmt, wenn zu einer aus zwei RTI bestehenden Kombinationstherapie ein PI (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) gegeben wurde (Cameron *et al.* 1998, Gulick *et al.* 1997, Mouton *et al.* 1997, Palella *et al.* 1998). Die Kombinierbarkeit der Wirkstoffe ist dabei jedoch aufgrund von antagonistischen und synergistischen Interaktionen, Potenzierungen der Nebenwirkungen und wechselseitige Veränderungen des Plasmaspiegels limitiert.

1.5 Therapieversagen und Resistenzentwicklung

Durch die hochwirksame antiretrovirale Kombinationstherapie (HAART) wurde der natürliche Verlauf der HIV-Infektion grundlegend beeinflusst. Die Senkung der Viruslast im Plasma korreliert mit einem Anstieg der CD4⁺-Lymphozyten und führt zu einer Verlängerung der asymptomatischen Phase. An den sinkenden AIDS-Fallzahlen bei gleichbleibender Neuinfektionsrate ist seit Einführung von HAART 1996 der erfolgreiche Einsatz dieser Medikation abzulesen (HIV/AIDS Halbjahresbericht II/2000). Dennoch kommt es bei vielen Patienten nach einer initialen Unterdrückung der Virusreplikation (meist <50 Viruskopien/ml Plasma) zu einem Therapieversagen, das gekennzeichnet ist durch den Wiederanstieg der Viruslast.

Neben der Entstehung therapie-resistenter Viren (siehe Kapitel 1.6) ist eine niedrige Bereitschaft bzw. Fähigkeit des behandelten Patienten (Adhärenz/Compliance), das zum Teil sehr strenge und komplexe Therapieregime einzuhalten, eine der Hauptursachen für ein Therapieversagen. Studien zeigten, dass maximale virologische Ansprechraten nur durch eine mehr als 95%ige Einnahme der Tagesdosen erreicht werden können. Bereits ein Rückgang der Einnahmehäufigkeit auf 90% bis 95% führt zu einem Abfall der virologischen Ansprechrate von 81% auf 64% (Paterson *et al.* 2000).

Unterschiedliche Plasmaspiegel der Substanzen und unzureichende intrazelluläre Wirkstoffspiegel entstehen jedoch auch bei guter Compliance durch individuelle, unterschiedliche Metabolisierung der Wirkstoffe und/oder Unterschiede in ihrer Pharmakokinetik (Bruno *et al.* 2001, Anderson und Fletcher 2001, Fletcher 1999). Zelluläre Resistenzmechanismen wie z.B. die verminderte Aktivierung von NRTI durch Kinasen oder der aktive Transport der Therapeutika durch Membranproteine (MDR-1, MRP-4) führen ebenso zu einem verminderten Spiegel der Wirkstoffe (Gröschel *et al.* 1997, Schuetz *et al.* 1999).

Unter einer nicht vollständig suppressiven antiretroviralen Therapie findet eine kontinuierliche Virusvermehrung statt. Durch den Replikationsvorteil, den resistente Virusmutanten gegenüber dem durch ART gehemmten Wildtyp haben, kommt es zu einem Wiederanstieg der Viruslast und damit zu Therapieversagen. Diese resistenten Viren entstehen durch Spontanmutation während der residuellen Virusvermehrung oder sind aufgrund der hohen Mutationsrate und der hohen Replikationsrate von HIV bereits vor Einleiten einer Therapie mit einer hohen statischen Wahrscheinlichkeit vorhanden. Bei einer Halbwertszeit von 1,6 Tagen für produktiv infizierte CD4⁺-Zellen und von 0,3 Tagen für HIV wird eine Neuproduktion von 10⁹ Viren pro Tag berechnet (Perelson *et al.* 1996). So können in asymptomatischen Patienten mehr als 10⁶, in AIDS-Patienten sogar mehr als 10⁸ genetisch verschiedene Virusvarianten vorliegen.

1.6 Resistenz gegen antiretrovirale Wirkstoffe

Viruspopulationen mit Mutationen, die in Anwesenheit eines Inhibitors einen Wachstumsvorteil aufweisen, werden als „resistent“ bezeichnet. Dabei ist der Ausdruck „Resistenz“ als relative Größe im Vergleich zum sensitiven Virus-Wildtyp zu verstehen. Ursache der HIV-Resistenz sind meist Mutationen in den HIV-1 codierten therapeutischen Zielenzymen (Protease und Reverse Transkriptase). Diese resistenz-assozierten Mutationen werden unter der Angabe des Codons, sowie der im Wildstamm erwarteten und der in der mutierten Form vorliegenden Aminosäure beschrieben (z.B. M184V, hier liegt eine Substitution des im Wildtyp vorhandenen Methionins durch Valin durch Mutation des Codon 184 vor).

Primärmutationen zeichnen sich durch frühes Auftreten und ihre Korrelation zu einem bestimmten Medikament aus. Diese auch als „Schlüsselmutationen“ bezeichneten Aminosäureaustausche sind oft im oder in der Nähe des aktiven Zentrums des entsprechenden Enzyms lokalisiert. Als sekundäre oder kompensatorische Mutationen werden diejenigen Veränderungen bezeichnet, die nicht in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms auftreten und mitunter die Funktionsfähigkeit (virale Fitness) des Enzyms erhöhen (Hirsch *et al.* 1998). Diese Mutationen, die generell in viralen Genomen akkumulieren, die bereits eine oder mehrere primäre Mutationen aufweisen, können mit einer Minderung der Sensitivität gegenüber Substanzen der gleichen Wirkstoffklasse einhergehen (Kreuzresistenzen).

1.6.1 Resistenz gegen Reverse Transkriptase Inhibitoren (RTI)

Resistenz gegen NRTI

Resistenz gegen NRTI resultiert aus Nukleotidaustauschen innerhalb des RT Genoms, die Aminosäuresubstitutionen in dem transkribierten Enzym bedingen. Durch diese Aminosäureaustausche ändert sich die räumliche Struktur des aktiven Zentrums und/oder die Struktur in Regionen des Enzyms, die mit ihm assoziiert sind. Diese strukturelle Anpassung führt wahrscheinlich dazu, dass vornehmlich die natürlichen Nukleotide anstelle der intrazellulär aktivierten Triphosphate der Inhibitoren in die entstehende DNA eingebaut werden. Die Komplexität der Funktion dieser Strukturänderungen der RT im Zusammenhang mit NRTI-Resistenzen sind im Detail noch nicht verstanden, so dass weitere Strukturanalysen der funktionalen Regionen der HIV-1 RT notwendig sind (Loveday *et al.* 2001). Es ist jedoch bekannt, dass durch NRTI-assozierte Mutationen die durch Pyrophosphat und/oder ATP katalysierte Rückreaktion der Reversen Transkription (Pyrophosphorolyse) verstärkt werden kann. Außerdem können NRTI-assozierte Mutationen eine Erhöhung der nukleotid-

abhängigen Primerfreigabe bewirken, bei der das zuletzt in die entstehende DNA eingebaute Nukleotid entfernt und an ein freies Nukleotid unter Ausbildung eines Dinukleosidpolyphosphats angehängt wird (Arion *et al.* 1998, Meyer *et al.* 1998).

AZT-assoziierte Resistenzmutationen wurden an den Codons 41, 67, 70, 210, 215 und 219 identifiziert (Larder *et al.* 1989, Kellam *et al.* 1992). Veränderungen in diesen Enzymregionen führen zu einer starken Resistenz gegenüber AZT, wobei isolierte Mutationen nur eine geringe Minderung der Sensitivität bewirken. Jedoch reduziert eine Mutation an Codon 215 prognostisch den Langzeiterfolg einer kombinierten Dreifachtherapie (HAART) mit AZT deutlich. Die Resistenz der Viren gegen AZT ist mit der Pyrophosphorolyse assoziiert. Das heißt, Viren, die mit Resistenz gegen AZT assoziierte Mutationen (hauptsächlich D67N und K70R), in der RT tragen, zeigten eine verstärkte Pyrophosphorolyse, so dass anstelle des Kettenabbruchs die Replikation fortgeführt wird.

Das Thymidinanalogon d4T selektiert Viren, die AZT-assoziierte Mutationen tragen, so dass die oben genannten Mutationen der Reversen Transkriptase hauptsächlich als Thymidinanalogon assoziierte Mutationen (TAM) bekannt sind.

DdI- (Codons 65, 74, 184) und ddC-assoziierte Resistenzmutationen (Codons 65, 69, 74, 184) unterscheiden sich von AZT-Mutationen (Hirsch *et al.* 1998), jedoch können die den Agenzien zugeordneten Mutationen überlappen und akkumulieren (siehe Tabelle 1), wodurch Kreuzresistenzen zwischen verschiedenen Substanzen dieser Wirkstoffklasse entstehen können.

Die Substitution des Methionin an AS-Position 184 der RT durch ein Valin (M184V) bewirkt eine mehr als 100fache Resistenz gegen 3TC. Hier bewirkt eine einzelne Punktmutation eine starke Resistenz gegen einen NRTI (Schinazi *et al.* 1993, Tisdale *et al.* 1993). Diese Mutation vermindert die virale Fitness und führt zur Minderung einer bereits bestehenden Thymidinanalogon-Resistenz (Feng *et al.* 1999, Boyer *et al.* 2002) durch Inhibition der Phosphorolyse (Götte *et al.* 2000). *In vitro* Untersuchungen ergaben für die M184V-Substitution zusätzlich schwache Kreuzresistenzen zu ddI, ddC und ABC (Gao *et al.* 1993).

Aufgrund von *in vitro* Studien wurden vier Mutationen für Abacavir beschrieben (65, 74, 115 und 184, Miller *et al.* 2000). Diese Substitutionen können entweder einzeln oder in Kombination vorliegen. AZT-spezifische Mutationen (z.B. 41, 210, 215) erhöhen die Resistenz gegenüber Abacavir (Schmidt *et al.* 2001). *In vivo* Studien zeigten, dass mehr als 90% 3TC bzw. AZT resistenter HIV-Isolate sensitiv gegenüber ABC reagierten (Mellors *et al.* 1998).

Die Akkumulation bestimmter Mutationen im für die Reverse Transkriptase codierenden *pol*-Gen führt zu einem fast vollständigen Wirkungsverlust aller NRTI. Diese Multiresistenzen (MDR: *multi drug resistance*) sind beschrieben für den Q151M-Komplex und die T69SS-

Insertion. Im Q151M-Komplex ist dieser Aminosäureaustausch für die Resistenz unabdingbar, während die mit dem Komplex assoziierten Mutationen an den Positionen 62, 75, 77 und 116 vermutlich die Fitness des Virusstamms erhöhen (Iversen *et al.* 1996, Shirasaka *et al.* 1995). Zusätzlich zu den Substitutionen korrelieren Insertionen mit Multiresistenz. Die T69SSS-Insertion enthält an Position 69 sechs zusätzliche Basenpaare, so dass die dort im Wildtyp vorhandene Aminosäure Threonin durch drei Serin-Reste ersetzt wurde (Winters *et al.* 1998).

Tabelle 1: NRTI-assoziierte Resistenzmutationen

NRTI	Primäre Mutationen	Sekundäre Mutationen	Kreuzresistenz
AZT	K70R, T215Y	M41L, D67N, T215F, L210W, K219Q/E	hochresistente Stämme gegen andere RTI
d4T	AZT-typische Mutationen	V75T,	
ddI	L74V	K65R, M184V/I	ddC, 3TC
ddC	K65R, T69D, L74V, M184V/I	keine	ddI, 3TC
3TC	E44D, V118I, M184V/I	keine	ddI, ddC
ABC	K65R, L74V, M184V	M41L, D67N, K70R, Y115F, L210W, T215Y/F, K219Q	3TC, ddI, ddC
MDR-A	Q151M,	A62V, V75T, F77L, F116Y	alle NRTI
MDR-B	T69SSS	M41L, A62V, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q	alle NRTI

(Hirsch *et al.* 2000, Schinazi *et al.* 2000, Peiperl 2001)

Resistenz gegen NtRTI

Das Resistenzprofil des NtRTI (Tenofovir) unterscheidet sich von dem der NRTI, jedoch gelten die Thymidinanalogon-assoziierten Mutationen (TAM) für TDF als sekundäre Mutationen (D'Aquila *et al* 2001). HIV, die eine Q151-Multiresistenzmutation aufweisen sind durch diese Wirkstoffklasse noch hemmbar. Auch bei Vorliegen einer 69S-Insertion zusammen mit der 3TC-assoziierten M184V-Substitution ist das entsprechende Virus nicht gegen NtRTI resistent (Miller *et al.* 2001). Als primäre, mit Resistenz gegen TDF-assoziierte Mutation ist der Austausch von Lysin durch Arginin an Position 65 der Reversen Transkriptase beschrieben (Peiperl 2001).

Resistenz gegen NNRTI

Die NNRTI Nevirapin, Efavirenz und Delavirdin sind hochspezifische Substanzen, die allosterisch das katalytische Zentrum der HIV-1 Reversen Transkriptase hemmen (siehe Kapitel 1.4.2). Veränderungen der Aminosäuresequenz, die mit einer Modifikation der dreidimensionalen Struktur der Bindungsstelle einhergehen, führen meist zu einem Wirkverlust der gesamten Medikamentengruppe. Die resistenz-assoziierten Mutationen befinden sich in den Bereichen der Codons 100-108 und 181-239 (siehe Tabelle 2). Der durch die bereits vorhandene Mutation Y181C begünstigte Austausch von Lysin durch Asparagin an Codon 103 (K103N) führt zu einer Kreuzresistenz gegen alle NNRTI.

Tabelle 2: NNRTI-assoziierte Resistenzmutationen

NRTI	Primäre Mutationen	Sekundäre Mutationen	Kreuzresistenz
NVR	K103N, V106A, V108I, Y181C, Y188C, G190A	L100I,	DLV, EFV (K103N)
DLV	K103N, Y181C	P236L	NVP, EFV (K103N)
EFV	K103N, Y181C, Y188C, G190A	L100I, V108I, V179D, P225H	DLV, NVP (K103N)

(Hirsch *et al.* 2000, Schinazi *et al* 2000, Peiperl 2001)

1.6.2 Resistenz gegen Proteaseinhibitoren (PI)

Mit PI-Resistenz assoziierte Mutationen der Protease wurden an mehr als 20 Positionen identifiziert (siehe Tabelle 3). Einige von ihnen sind im aktiven Zentrum, dem „flap“ oder anderen konservierten Regionen des Enzyms lokalisiert. Mutationen im aktiven Zentrum des Enzyms (Codon 30, 32, 48, 50, 82, 84) und der „flap“-Region (Codon 46-56) zeigen eine unmittelbare Auswirkung auf die Resistenz der entsprechenden Viren (Primärmutationen). Diese Mutationen vermitteln Resistenz durch strukturelle Änderungen der substratbindenden Region, woraus eine niedrigere Affinität zu den substratähnlichen Inhibitormolekülen resultiert (Baldwin *et al.* 1995, Chen *et al.* 1995, Olsen *et al.* 1999).

Sekundärmutationen bewirken wahrscheinlich Veränderungen der Enzymkatalyse, Stabilisierungen des Dimers, Änderungen in der Bindungskinetik des Inhibitors oder bewirken über große Distanzen die Umstrukturierung des aktiven Zentrums (Xie *et al.* 1999, Rick *et al.* 1998, Erickson *et al.* 1999). Obwohl Primärmutationen relativ substanzspezifisch sind, führt die Akkumulation weiterer Sekundärmutationen zu einer breiten Kreuzresistenz zwischen den Proteaseinhibitoren. Darüber hinaus ist die Zeitdauer bis zur Selektion von Viren mit Primärmutationen signifikant verkürzt, wenn bereits Sekundärmutationen vorliegen (Simon und Arasteh 1999).

Tabelle 3: PI-assoziierte Resistenzmutationen

PI	Primäre Mutationen	Sekundäre Mutationen
SQV	G48V, L90M	L10I/R/V, I54V/L, A71V/T, G73S, V77I, V82A/T/F, I84V
RTV	V82A/T/F, I84V	L10I/R/V; K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, I54V/L, A71V/T, V77I, L90M
IDV	M46I/L, V82A/T/F; I84V	L10I/R/V, K20M/R, L24I, V32I, M36I/L, I54V/L, A71V/T, G73S/A, L90M
NFV	D30N; L90M	L10F/I, V32I; M36I, M46I/L, A71V/T, V77I, V82S, I84V, N88D/S,
APV	I50V; I84V	L10I/R/V, V32I, M46I; I47V; I54V,
MDR*	M46I/L, V82A/F/T/S, I84V, L90M	L10I/F/R/V, I54V/M/L

*MDR: Multiresistenz, Akkumulierung von mindestens vier Mutationen bewirkt Resistenz gegen mehrere PI

(Hirsch *et al.* 2000, Schinazi *et al.* 2000, Peiperl 2001)

1.6.3 Subtyp-spezifische Resistenz (natürliche Polymorphismen)

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität von HIV ist es möglich, dass in Wildtypisolaten verschiedenen Subtyps (siehe Kapitel 1.2) Aminosäuren enthalten sind, die dazu führen, dass das entsprechende Virus eine sogenannte „Subtyp-spezifische Resistenz“ aufweist. Diese resistenz-assoziierten Aminosäuren sind in den entsprechenden Subtypen als natürliche Polymorphismen vorhanden und nur in Bezug auf einen sensitiven Wildtypstamm eines anderen Subtyps als Mutation anzusehen. Die meisten Vertreter des HIV-1 Subtyps B, anhand dessen die heute zur Verfügung stehenden Medikamente entwickelt wurden, tragen diese resistenz-assoziierten Aminosäuresubstitutionen in der Protease an Position 63 und in der Reversen Transkriptase an den Positionen 211 und 214. Abhängig von dem als Referenz eingesetzten Wildtypstamm liegen an dieser Position entweder die Aminosäuren Leucin (Protease) oder Arginin bzw. Leucin (Reverse Transkriptase) vor, oder aber die resistenz-verstärkenden Aminosäuren Prolin (L63P), Lysin (R211K) bzw. Phenylalanin (L214F). Bis auf die NRTI-assoziierten Aminosäuren 179I, 211S und 214F in den Subtypen A und D und 211K in Subtyp F entspricht die Primärstruktur der Reversen Transkriptase an den resistenz-assoziierten Codons derjenigen des RTI-sensitiven HIV-1 Subtyps B (Shafer *et al.* 1997, Becker-Pergola *et al.* 2000, Sato *et al.* 2000, Apetrei *et al.* 1998).

Subtyp-spezifische Resistenzen sind aufgrund der Inhibitionsmechanismen vor allem gegen NNRTI und PI zu erwarten. HIV-1 Subtyp O zeigt eine natürliche Resistenz gegen NNRTI, ist jedoch gegen NRTI hochsensitiv. Hier wirken die Aminosäuren 98G, 103R und 181C resistenzvermittelnd (Descamps *et al.* 1997). Ebenso ist eine Inhibition von HIV-2 aufgrund der zu HIV-1 unterschiedlichen Struktur der Bindungstasche durch NNRTI nicht möglich. Die Vertreter der HIV-1 M-Gruppe (siehe Kapitel 1.2) sind gegen diese Wirkstoffklasse sensitiv.

PI-Resistenz assoziierte Aminosäuresubstitutionen in der HIV-1 Gruppe M sind in den non-B Subtypen signifikant häufiger vertreten, als in Isolaten des Subtybs B. So wiesen nach Pieniazek *et al.* (2000) 85% der non-B Isolate mindestens eine Mutation an den Positionen 10, 20, 30, 36, 46, 71, 77 und 82 auf. Aufgrund dieser bereits vorhandenen resistenz-assoziierten Aminosäuren ist eine schnelle Resistenzentwicklung unter Therapie zu erwarten. Eine verminderte Sensitivität (phänotypische Resistenz, siehe Kapitel 1.7.2) gegenüber Proteaseinhibitoren zeigen jedoch nur Viren des Subtyps G (Descamps *et al.* 1998).

1.7 Methoden der Resistenztestung

1.7.1 Genotypische Resistenzbestimmung

In der genotypischen Resistenzbestimmung wird mit molekularbiologischen Untersuchungen die Nukleotidsequenz der *pol*-Region von HIV bestimmt und daraus die Aminosäuresequenz der HIV codierten Protease und Reversen Transkriptase ermittelt, die anschließend mit der eines sensitiven Referenzstammes verglichen wird. Jede Veränderung zum Wildtyp wird dabei als Änderung einer Aminosäure an einem Codon angegeben (siehe Kapitel 1.6).

In umfangreichen klinischen und *in vitro* Studien wurden die resistenz-assoziierten Mutationen ermittelt (Zusammenfassung Schinazi *et al.* 2000, Los Alamos Database). Die Ergebnisse dieser Studien werden in Datenbanken zusammengefasst, die von internationalen Experten eingerichtet und aktualisiert werden (z.B. The Drug Resistance Mutations Group, International AIDS Society). Diese werden zur Interpretation der Genotypisierung herangezogen, die aufgrund komplexer Mutationsmuster ohne Kenntnis der Studienergebnisse nicht möglich ist. Es wurden Auswertungsalgorithmen erstellt, die die einzelnen Mutationen bezüglich ihrer resistenzvermittelnden Eigenschaften unterschiedlich stark gewichten (z.B. französische Richtlinien <http://www.sante.gouv.fr>). Basierend auf diesen Algorithmen wurden Vorhersagedatenbanken erstellt, die die computergestützte Analyse der Genotypisierung und damit die Vorhersage der Resistenzeigenschaften des untersuchten Virus ermöglichen (Stanford Database: <http://hivdb.stanford.edu>; Los Alamos Database: <http://hiv-web.lanl.gov>, antiviral drug resistance online: <http://www.viral-resistance.com>; geno2pheno (Arevir): <http://cartan.gmd.de>).

Genotypische Resistenzanalysen sind schnell und relativ kostengünstig durchführbar, jedoch sind nur bereits bekannte Mutationen interpretierbar und eine klinische Relevanz der detektierten Resistenz ist oftmals fraglich. Andererseits ist der Nachweis von Schlüsselmutationen (siehe Kapitel 1.6), die auf eine schnelle Resistenzentwicklung hinweisen und die Ermittlung von neuen, bislang nicht bekannten Mutationen möglich (Simon und Arasteh 1999).

1.7.2 Phänotypische Resistenzbestimmung

Phänotypische Untersuchungen definieren die Wachstumsfähigkeit eines Virus in Anwesenheit eines Inhibitors im Vergleich zu einem sensitiven Wildtypvirus. Die dazu benötigten Viren werden aus dem Plasma des Patienten auf Leukozyten angezüchtet, dabei können jedoch aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks nicht repräsentative Varianten selektioniert werden. Neuere Methoden verwenden rekombinante Viren, in denen entweder durch homologe Rekombination oder durch Komplettierung deletierter Plasmide mit der zu untersuchenden HIV *pol*-Region rekombinante Virusstocks hergestellt werden, deren Resistenz gegenüber steigenden Medikamentenkonzentrationen in Zellkulturen ermittelt wird.

Diese Resistenzanalysen benötigen aufgrund der Verwendung infektiöser, z.T. rekombinanter Viren einen hohen Sicherheitsstandard (BSL3), sind relativ zur Genotypisierung zeitaufwendig und sehr teuer. Sie bieten jedoch die Möglichkeit vorliegende Resistenzen und Kreuzresistenzen direkt *in vitro* zu erfassen (Simon und Arasteh 1999). Die Interpretation des Phänotyps ist zwar wesentlich einfacher als die des Genotyps, die Aussagekraft ist jedoch von der korrekten Wahl eines klinisch relevanten Cut-offs abhängig. Mit dem klinischen Verlauf korrelierte Cut-off Bestimmungen existieren derzeit nur für wenige Substanzen.

1.8 Aufgabenstellung

Resistenz gegenüber antiretroviralen Substanzen limitiert den Erfolg der antiretroviralen Kombinationstherapie von HIV-1 Infektionen. Ursache der viralen Resistenz sind Mutationen in den HIV-1 kodierten Enzymen Protease (PR) und Reverse Transkriptase (RT) gegen die, die aktuell eingesetzten Medikamente gerichtet sind. Seit 1996 werden PR- und RT-Inhibitoren in der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) kombiniert eingesetzt. Therapieversagen, das durch einen Wiederanstieg der Viruslast gekennzeichnet ist, wird häufig beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit sollen Viren aus therapie-naiven HIV-1 infizierten Patienten, die im Rahmen der Serokonverterstudie des Robert Koch-Instituts rekrutiert wurden, auf ihre Resistenzeigenschaften untersucht werden, um eine Aussage über die Häufigkeit und Dynamik der Übertragung resistenter HIV-1 in Deutschland treffen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen übertragene resistente bzw. multiresistente Virusvarianten hinsichtlich ihrer replikativen Eigenschaften charakterisiert werden, da die Vermehrungsfähigkeit (virale Fitness) für die Übertragungseffizienzen und die Ausbreitungsdynamik der Viren von Bedeutung ist.