

3 Methoden

3.1 Extraktion viraler RNA

aus Plasma

Die Extraktion viraler RNA aus Plasma wurde mit dem „Sample Preparation Modul“ des „HIV Genotyping“ Kits (AB Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Dazu wurden zunächst zur Entfernung von Kryopräzipitaten 650 µl EDTA-Plasma 10 Minuten bei 4°C mit 3.000 x g zentrifugiert. Zur Viruspelletierung wurden anschließend 500 µl des Überstands 90 Minuten bei 17.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Viren für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 600 µl Lysispuffer lysiert. Die virale RNA wurde durch Zugabe von 600 µl Isopropanol (100%, Merck, Darmstadt) und anschließender Zentrifugation (15 Minuten, Raumtemperatur, 17.000 x g) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 12,5 µl RNA Diluent (AB Biosystem, Weiterstadt) resuspendiert.

aus Zellkulturüberstand

Die RNA-Extraktion aus Zellkulturüberstand erfolgte nach dem „QIAamp Mini Protocol for RNA Cleanup“ (QIAGEN, Hilden). Dazu wurden zunächst 20 µl Zellkulturüberstand (Virusstock) mit 10 µg tRNA (*E.coli*, Boehringer, Mannheim), 350 µl RLT-Puffer (enthält 1,0 % β-Mercaptoethanol) und 250 µl Ethanol gemischt. Die Mischung wurde auf eine „QIAamp Spin“-Säule gegeben, welche anschließend für eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit zunächst 700 µl RW1-Puffer und im Anschluß daran zwei mal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde mit 60 µl RNase freiem H₂O (Fluka, Seelze) eluiert und aliquotiert bei -70°C gelagert.

DNaseI-Verdau

Der DNaseI-Verdau erfolgte nach dem „RNeasy Mini Protocol for the Isolation of total RNA from Animal cells“ (QIAGEN, Hilden) direkt auf der Säule. Dazu wurde wie beschrieben die RNA aus Zellkulturüberstand an das Säulenmaterial gebunden. Der erste Waschschrift erfolgte mit 350 µl RW1-Puffer. Anschließend wurden 10 µl DNaseI in 70 µl RDD-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren

Waschschritt mit 350 μ l RW1-Puffer wurde mit RPE-Puffer gewaschen und mit 2x 30 μ l H₂O eluiert.

3.2 Synthese der cDNA aus RNA

mit spezifischen Primern

Zur Synthese einzelsträngiger cDNA wurden die Reverse Transkriptase „Superscript“ (RNA-abhängige DNA-Polymerase, Gibco/BRL, USA) und ein spezifischer Primer „3532s“ (siehe Tabelle 5) verwendet. 5 μ l der aus Plasma extrahierten RNA (200 μ l Serumäquivalent) wurden zunächst zusammen mit 5 μ l H₂O und einem Tropfen Öl (Sigma, Deisenhofen) zur Denaturierung der Sekundärstrukturen für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden dem Ansatz 10 μ l RT-PCR-Mix (siehe Tabelle 4) zugegeben und für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 7 Minuten auf 93°C erhitzt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Tabelle 4: RT-PCR-Mix

	Konzentration final
5 x RT-Puffer (enthält 1,5 mM MgCl ₂)	1 x
DTT (100 mM)	5 mM
MgCl ₂ (50 mM)	3 mM
dNTP (2,5 mM)	0,5 mM
RNasin (40U/ μ l)	20 U
RT (200 U/ μ l)	100 U
Primer 3532s (10 μ M)	0,05 μ M
H ₂ O (RNase frei)	ad 10 μ l

mit Oligo (dT)

Zur cDNA-Synthese aus viraler RNA wurden 500 ng Oligo (dT)-Primer mit 0,4 μ l dNTPs (25 mM), 1,6 μ l H₂O und 10 μ l RNA für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf 37°C abgekühlt. Anschließend wurden der Mischung 4 μ l 5fach "first strand" RT-Puffer (Gibco, BRL), 2 μ l DTT (0,1 M) und 1 μ l H₂O zugesetzt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei

37°C wurde 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco/BRL, USA) zugegeben und für weitere 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Lösung anschließend für 15 Minuten auf 70°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.3 Semi-Nested PCR zur Amplifizierung der DNA

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte durch eine DNA-Synthesereaktion zwischen zwei gegenläufigen Primern, die zu dem 3'- bzw. 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts komplementär sind. Die Synthese der DNA wurde in einer semi-nested PCR mit dem „Expand High Fidelity PCR System“ (Boehringer, Mannheim) durchgeführt, in dem eine Mischung aus thermostabilen DNA-Polymerasen aus den Bakterien *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) und *Pyrococcus woesei* (Pwo-Polymerase) enthalten ist. Die Mischung ermöglicht durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der Pwo-Polymerase die Synthese großer DNA-Fragmente (bis 12 kb) mit niedriger Fehlerrate. Durch diese Aktivität ist das Enzym in der Lage am 3'-Ende falsch eingebaute oder gepaarte Nukleotide herauszuschneiden und durch das richtige zu ersetzen.

In einer nested PCR (verschachtelte PCR) wird in einer zweiten PCR-Runde das Produkt aus der ersten PCR-Runde als Matrize verwendet. Durch diese Methode erhöht sich die Empfindlichkeit und die Spezifität, da nahezu alle unspezifischen Produkte unberücksichtigt bleiben. Die semi-nested PCR wird mit einem Primer aus der ersten PCR-Runde und einem eingrückten Primer durchgeführt.

Jede der PCR-Runden setzt sich aus drei Schritten zusammen:

Im ersten Schritt wird die doppelsträngig vorliegende Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstränge denaturiert. Anschließend erfolgt eine Abkühlung auf die Temperatur bei der die Primer spezifisch hybridisieren (primerabhängig zwischen 50°C und 65°C), so daß die Polymerase die 3'-OH-Enden der hybridisierten Primer als Startpunkte für die Synthese verwenden kann. Der dritte Schritt besteht aus einer Erwärmung auf 72°C (Temperaturoptimum der Polymerase). Bei dieser Temperatur werden von der Polymerase, ausgehend von den Primern, an jedem Einzelstrang komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. Dieser Zyklus wird 30-35 mal wiederholt, so daß eine exponentielle Amplifikation der DNA-Moleküle erreicht wird.

Durch die Verwendung von geeigneten Primern ist es möglich in die PCR-Fragmente Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzuführen. Die Primer enthalten dann zusätzlich an ihrem jeweiligen 5'-Ende die Restriktionsschnittstelle, die zunächst nicht mit dem Template hybridisiert. Die Amplifikation der *pol*-Fragmente erfolgte mit Primern, die eine Schnittstelle für *Apa*I (sense, 2001s) bzw. *Nhe*I (antisense, 3454as) enthielten.

Tabelle 5: Verwendete Primer

2001 s	(nt 2001-2028)*	5'-TgC <u>Agg gCC CCT</u> AgR AAA ARg ggC TgT T
3532 as	(nt 3532-3505)*	5'-TTC TgC TAT TAA gTC TTT TgA Tgg gTC A
3454 as	(nt 3454-3424)*	5'-Agt <u>gCT AgC</u> TCT gCT TCT TYT gTT AgT ggT A

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

*Koordinaten HIV HxB2 EMBL-Datenbankeintrag AX283583

Tabelle 6: PCR-Ansatz

Reagenz	Konz. final
cDNA (siehe Kapitel 3.15.2)	10 μ l
Primer 2001 s (10 μ M)	0,22 μ M
Primer 3532 as (10 μ M)	0,22 μ M
MgCl ₂ (50 mM)	3,9 mM
10 x Boehringer-Puffer 3	1 x
dNTP (je 2,5 mM)	je 0,2 mM
Polymerase (<i>Taq/Pwo</i>) (3,5 U/ μ l)	1,75 U
H ₂ O	ad 50 μ l

Die zweite PCR-Runde wurde mit 2,5 μ l Produkt aus der ersten PCR-Runde, den Primern 2001 s (0,44 μ M) und 3454 as (0,44 μ M) einer finalen MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM, 0,2 mM dNTP und 1,75 U Polymerase in Boehringer Puffer 3 angesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben, mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet und wie in Tabelle 7 angegeben im Thermozykler (Perkin Elmer, Weiterstadt) inkubiert.

Tabelle 7: PCR-Bedingungen

1x	Denaturierung	2 Minuten	95°C
10 Zyklen	Denaturierung	20 Sekunden	95°C
	Hybridisierung	30 Sekunden	60°C
	Synthese	2 Minuten	72°C
20 Zyklen	Denaturierung	20 Sekunden	95°C
	Hybridisierung	30 Sekunden	60°C
	Synthese	*2 Minuten + 20 Sekunden	72°C
1x	Abschluß der Synthese	10 Minuten	72°C

*Auto Segment Extension: bei jedem Zyklus wird die Inkubationszeit um 20 Sekunden verlängert.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10fach Probenpuffer versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5-10V/cm Elektrodenabstand in horizontalen Gelelektrophoresekammern (Gibco/BRL) mit 1 x TAE-Laufpuffer in 0,8-2 % Agarose-Gelen (Sigma, in 1 x TAE plus 0,25 µg/ml Ethidiumbromid). Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit der zu trennenden Fragmentgrößen gewählt. Die DNA wurde durch interkalierendes Ethidiumbromid im UV-Licht (Wellenlänge von 254 nm bzw. 366 nm) sichtbar gemacht (Sambrook *et al.* 1989).

10 x TAE-Puffer

Tris	400 mM
EDTA	10 mM
Natriumacetat	500 mM
pH 7,9	

10fach Probenpuffer

Ficoll 400	25 %	(v/v)
Bromphenolblau	0,25 %	(w/v)
in 10 x TAE-Puffer		

3.5 Aufreinigung von DNA

Präparation von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden präparative Agarose-Gele gefertigt. Dazu wurden die Zähne eines Kammes so abgeklebt, daß Taschen für größere Probenvolumina entstanden. 45 µl - 60 µl des mit 10fach Probenpuffer versetzten PCR-Ansatzes wurden auf das Gel aufgetragen und für 2 bis 4 Stunden bei 40-60 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden bei langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die im Gel enthaltene DNA wurde mit dem „Jetquick Gel Extraction“ Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Anweisungen des Herstellers eluiert. Die DNA wurde in 40 µl H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Aufreinigung der PCR-Fragmente

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente von der Polymerase, überschüssigen Oligonukleotiden und dNTP erfolgte mit dem „PCR Purification“ Kit (QIAGEN, Hilden) aus 45 µl PCR-Ansatz nach Anleitung des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 40 µl 10 mM Tris-Puffer, pH 8,5 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.6 Quantifizierung von DNA-Proben

Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Das Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 37 µg/ml einzelsträngiger Nukleinsäure. Der Grad der Reinheit einer Nukleinsäurepräparation kann ebenfalls photometrisch bestimmt werden, da Nukleinsäuren bei 280 nm halb-maximal absorbieren. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm einer reinen Nukleinsäurelösung beträgt 2,0. Verunreinigungen durch Proteine, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt, verringern diesen Quotienten entsprechend. Plasmid-DNA wurde in einer 1:20 Verdünnung in H₂O photometrisch quantifiziert.

Bestimmung der DNA-Konzentration durch Ethidiumbromid-Färbung im Agarose-Gel

Geringe DNA-Mengen wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese quantifiziert. Dazu wurde ein Aliquot der zu bestimmenden DNA und ein DNA-Konzentrationsstandard (Lambda Hind Marker für Plasmid-DNA bzw. Low Mass DNA Marker für PCR-Fragmente; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel geeigneter Konzentration aufgetrennt. Durch einen Vergleich der Bandenintensität wurde die Konzentration der DNA-Probe abgeschätzt oder mit Hilfe der Software Easyquant (Herolab) ausgewertet.

3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxykettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1992). Dabei wird das Prinzip einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, siehe Kapitel 3.3) mit einem kontrollierten basenspezifischen Abbruch der enzymatischen Replikation durch den Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphat-Analoga (ddNTP) verwendet ("cycle sequencing"). Als Matrize für diese Synthese dient die zu sequenzierende DNA, als Primer ein kurzes komplementäres, synthetisch hergestelltes Oligonukleotid. Es werden sowohl Desoxy-Nukleotide (dNTP) als auch Didesoxy-Nukleotide (ddNTP) angeboten, die zu einem Kettenabbruch führen, so dass eine statistische Verteilung unterschiedlich langer DNA-Fragmente entsteht. Diese wurden dann auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel in einem Sequenzierautomaten (377, AB Biosystems) ihrer Größe nach aufgetrennt.

Zur Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde das „1 x PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing“ Kit verwendet, zur Sequenzierung der *pol*-Fragmente das „Sequencing Modul“ des „HIV Genotyping“ Kits der Firma AB Biosystems (Weiterstadt). In beiden Kits ist in Abwandlung der Sanger-Methode jedes der vier ddNTPs an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welche während des Gel-Laufs von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch die unterschiedlichen Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe entstand ein Sequenzierungsmuster, das über ein Computerprogramm (Computer; Apple, Ismaning) ausgewertet wurde. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sequence Analysis, MT Navigator, Autoassembler und HIV Genotyping Sequence Analysis (AB Biosystems) ausgewertet.

Von dem eingesetzten Template wurden mit jeweils nur einem Primer in einem Endvolumen von 10 µl in einer PCR unter Sequenzierungsbedingungen Einzelstrang-Abschriften hergestellt. Die Produkte der Sequenzreaktion wurden dabei gleichzeitig zyklisch amplifiziert.

Tabelle 8: Sequenzierungsansatz

	Plasmid-DNA	PCR-Produkt
DNA	600-800 ng	60-100 ng
Primer	10 pmol	je 6 µl ViroSeq® HIV-1 Genotyping System Kit Sequencing Modul
Enzymmix	4 µl Big Dye®	Primer A-D und F-H
H ₂ O ad 10 µl		

Tabelle 9: Sequenzierung von Plasmiden

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
10 Sekunden	96 °C	} 25 x
5 Sekunden	55 °C	
4 Minuten	60 °C	
→ 4°C		

Tabelle 10: Sequenzierung von PCR-Produkten

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
10 Sekunden	96 °C	} 25 x
5 Sekunden	50 °C	
4 Minuten	50 °C	
→ 4°C		

Reinigung der Sequenzreaktionen

Zur Abtrennung überschüssiger fluoreszenzmarkierter ddNTPs, dNTPs und Primer wurde der gesamte Sequenzierungsansatz nach Abschluss der Reaktion im Thermozykler in einen Mix aus 80 µl H₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 250 µl Ethanol gegeben und das Präzipitat bei 17.000 x g und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen und rezentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstands wurde das Sediment im Vakuum getrocknet und bis zum Auftrag auf das Gel bei -20°C gelagert.

Denaturierende Sequenzgel-Elektrophorese

Vor dem Auftragen der Proben auf ein Sequenzgel wurde die DNA zur Auflösung von Sekundärstrukturen in 4 µl einer Mischung aus 1 Teil Formamid und 5 Teilen 50 mM EDTA pH 8,0 für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Die abgekühlten Proben wurden auf das Sequenzgel aufgetragen.

Die 5%igen Polyacrylamidgele (8 M Harnstoff in 1x TBE) zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden jeweils frisch aus entsprechenden Stammlösungen angesetzt und zwischen Glasplatten der Größe 34 x 25 x 0,4 cm gegossen. Zur Formung der Geltaschen wurde je nach Anzahl der Proben ein 64er oder 96er Kamm verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 2000 V und 50°C durchgeführt.

Sequenzgel

40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19/1)	7,5 ml
Harnstoff	30 g
10 x TBE	6,0 ml
H ₂ O	25 ml

5 x TBE

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	2 mM

3.8 Phylogenetische Analyse

Auffinden möglicher Infektketten

Zur Überprüfung des Vorliegens möglicher Infektketten und auf Kontamination wurde das Megalign Modul des Lazergene Softwarepaketes verwendet. Aus dem Alignment der Consensus-Sequenzen der Protease-Gene wurde eine Distanzmatrix und ein Stammbaum mit dem „Neighbourjoining“-Verfahren erstellt (ClustalW, Phylogenetic Tree). Das verwendete Softwaremodul Megalign gibt die Divergenz eines Sequenzpaares in Bezug zu der rekon-

struierten Phylogenie an. In diesem Programm entspricht die Divergenz eines Sequenzpaares dem Prozentsatz, den die Astlänge zwischen zwei betrachteten Sequenzen in Bezug auf die gesamte Pfadlänge im „Neighbourjoining“ Baum ausmacht (Summe aller Astlängen = 100%). In der Divergenztabelle werden auch die prozentualen paarweisen Sequenzidentitäten gelistet. Die Summe aus Prozent Divergenz und Prozent Identität ist daher in der Regel ungleich 100%.

Subtypbestimmung der HIV-Infektion

Zur Subtypbestimmung der HIV-1 Infektionen wurden phylogenetische Analysen unter Verwendung des Programm-Pakets PHYLIP (Felsenstein 1993) durchgeführt. Dazu wurden Alignments mit Referenzsequenzen aus einer Datenbank (siehe Tabelle 11, NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) und den zu untersuchenden HIV-1 *pol*-Sequenzen erstellt. Nach dem Berechnen der Distanzmatrix (K2P) mit "DNAdist" wurden phylogenetische Bäume mit der Neighbour-Joining (NJ) Methode konstruiert und mit "Treeview" dargestellt

Tabelle 11 zeigt die in der Stammbaumanalyse verwendeten Referenzsequenzen und ihre Bezeichnung im phylogenetischen Baum, zusammen mit ihrer Subtypzugehörigkeit. Ehemals als Subtyp-"I" bezeichnete Isolate werden CRF04-cpx genannt (CRF = zirkulierende rekombinante Formen), ihr Genom setzt sich aus den Subtypen A, G, H und unbekanntem Fragmenten mit mehreren "Bruchstellen" zusammen.

Tabelle 11: Referenzsequenzen für phylogenetische Analyse 288 bp *protease*-Gen

Bezeichnung im Baum	Subtyp	Accession-Number	Nr.
A_Kenia	A	AF004885	1
A_Somalia	A	AF069670	2
A_Uganda1	A	M62320	3
A_Uganda2	A	AF177357	4
B_FranceHxB2	B	K03455M38432	5
B_USA_LAV	B	M17451M12508	6
B_USA_87	B	U63632	7
B_USA_98	B	U21135	8
C_Brazil	C	U52953	9
C-BoWa_1	C	AF110967	10
C_BoWa_2	C	AF110980	11
C_Ethiop	C	U46016	12
C_India	C	AF067155	13
D_NDK_89	D	M27323	14
D_Zaire	D	U88822	15
D_Uganda	D	U88824	16
F1_Congo	F1	AF077336	17
F1_Brazil	F1	AF0055494	18
F1_Finland	F1	AF075703	19
F1_France	F1	AJ249238	20
F2_95_1	F2	AJ249236	21
F2_95_2	F2	AJ249237	22
G_Congo	G	AF084936	23
G_Finland	G	AF061641	24
G_Nigeria	G	U88826	25
G_Sweden	G	AF061642	26
H_Belg_1	H	AF190127	27
H_Belg_2	H	AF190128	28
H_CeAfRe	H	AF005496	29
J_Swed_1	J	AF082395	30
J_Swed_2	J	AF082394	31
K_99_1	K	AJ249235	32
K_99_2	K	AJ249239	33
AE_CeAfRe	CRF01-AE	U51188	34
AE_Thai_1	CRF01-AE	U54771	35
AE_Thai_2	CRF01-AE	U51198	36
AE_Thai_3	CRF01-AE	AB032741	37
AG_Dib_1	CRF02-AG	AG063223	38
AG_Dib_2	A/G CRF02-AG	AF063224	39
AG_Ghana	A/ CRF02-AG G	AF184155	40
AG_Nigeria	CRF02-AG (IbNG)	L39106	41
AB_Rus_1	CRF03-AB	AF193276	42
AB_Rus_2	CRF03-AB	AF193277	43
AG_Cyprus	CRF04-cpx, *A/G/H/K/U	AF049337	44
AGI_Gr_1	CRF04-cpx, *A/G/H/K/U	AF119820	45
AGI_Gr_2	CRF04-cpx, *A/G/H/K/U	AF119819	46
DF_Belgium	CRF05-DF	AF193253	47
DF_Congo	CRF05-DF	AF076998	48
AGJ_BuFa	CRF06-cpx, A/G/J/K	AF064699	49
AGJ_Africa	CRF06-cpx, A/G/J/K	AJ245481	50
O_Cameroon	O	L20571	51
SIVcpz_Fr	SIVcpz	X52154	52

3.9 Klonierung der *pol*-Fragmente

Plasmidpräparation und Reinigung

Zur Herstellung großer Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 100 µl einer frischen Übernachtskultur transformierter *E.coli* angeimpft und 13-15 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden geerntet (GSA-Rotor, 3000 rpm, 10 min) und durch alkalische Lyse aufgeschlossen (Sambrook *et al.* 1989). Die Plasmide wurden über eine Anionenaustausch-Chromatografie-Säule („JetStar Plasmid Maxi“ Kit, Genomed, Bad Oeynhausen) nach Vorschrift des Herstellers gereinigt. Nach der Elution der DNA von der Säule erfolgte eine Fällung durch Isopropanol. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und rezentrifugiert. Anschließend wurde es in TE-Puffer resuspendiert und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

TE-Puffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

LB-Medium

Bakto-Trypton	1 %
Bakto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	172 mM
pH 7,0	

Ligation der DNA-Fragmente

Das Vektorplasmid (pBSSK⁺ bzw. pHA5PRT) wurde über Nacht bei 37°C mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Nhe*I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) geschnitten, die erhaltenen Fragmente elektrophoretisch über präparative Agarose-Gele aufgereinigt (siehe Kapitel 3.5) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die amplifizierte *pol*-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Apa*I und *Nhe*I geschnitten und anschließend mit dem „PCR-

Purification“ Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Vektor- und Fragment-DNA wurden im molekularen Verhältnis 1:3 in T4-Ligase-Puffer aufgenommen und mit Hilfe von T4-Ligase entsprechend den Angaben des Herstellers (Promega) in einem Volumen von 10 µl ligiert. Die Ligation der *pol*-Fragmente in den pBSSK⁺-Vektor erfolgte für 2 bis 4 Stunden bei 37°C, zur Herstellung der pH5ΔPRT-*pol* Plasmide wurden das Vektor- und das *pol*-Fragment zusammen mit der T4-Ligase bei 16°C für 24 Stunden inkubiert.

3.10 Transformation

Präparation transformationskompetenter (Z-kompetenter[®]) Bakterien

50 ml SOB-Medium wurden mit 500 µl einer frischen *E. coli* XL1 Übernachtskultur angeimpft und bei Raumtemperatur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 (ca. 2×10^8 Zellen/ml) geschüttelt. Die Kultur wurde 10 Minuten auf Eis abgekühlt und die Bakterien pelletiert (2.500 x g, 6 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Wasch-Puffer (Z-competent Buffer Set, Zymo-Research, Kalifornien) resuspendiert und anschließend repelletiert. Die Bakterien wurden in 5 ml eisgekühltem „Competent-Puffer“ aufgenommen und aliquotiert bei -70°C gelagert (Schocktieffrierung).

SOB-Medium

Bakto-Trypton	2 %
Bakto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	8,6 mM
KCl	2,5 mM
pH 7,0	

Transformation Z-kompetenter *E. coli* XL1

Zur Transformation wurden je 100 µl Z-kompetente *E. coli* XL1 nach Auftauen auf Eis und 5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes gemischt und für 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf ampicillinhaltige 2xTY-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Anwesenheit eines Ampicillin-Resistenzgens auf

den Plasmiden konnten erfolgreich transformierte Bakterien auf dem Selektivmedium Kolonien bilden, die ausgezählt und weiter analysiert wurden.

2 x TY-Medium

Bacto-tryptone	16 g / l
Bacto-Hefe-Extrakt	10 g / l
NaCl	5 g / l
pH 7,0	

Nach dem Lösen der Substanzen und Einstellen des pH-Wertes wurde die Lösung zum Sterilisieren autoklaviert.

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem 2xTY-Medium Bacto-Agar (15 g/l) und Ampicillin 100 µg/ml zugesetzt.

Transformation ultrakompetenter *E. coli* XL2

50 µl ultrakompetente *E. coli* XL2 (Stratagene, Kalifornien) wurden mit 5 µl 0,142 M β-Mercaptoethanol gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µl Ligationsansatz wurde das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock (30 Sekunden, 42°C) wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 250 µl des Transformationsansatz wurde auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und 13-15 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch das in den Platten enthaltene Ampicillin bildeten nur erfolgreich transformierte Bakterien Kolonien.

SOC-Medium

Bakto-Trypton	2 %
Bakto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	8,6 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM
pH 7,0	

3.11 Isolierung der rekombinanten Plasmide

pBSSK⁺-pol

Zunächst wurden 3 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) in einem 15 ml Glasröhrchen mit einer transformierten *E. coli* XL1 Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 13-15 Stunden bei 37°C mit 200 Upm geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden dann mit 17.000 x g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolation der Plasmide aus dem Bakterienpellet erfolgte mit dem „NucleoSpin Plasmid“ Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmide wurden bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

pH5ΔPRT-pol

Um größere Mengen hochreiner, für die Transfektion eukaryonter Zellen geeigneter Plasmide zu erhalten, wurden 3 ml einer frischen *E. coli* XL2 (XL2-Blue Ultracompetent Cells, Stratagene, Kalifornien) Übernachtskultur zentrifugiert (siehe Kapitel 3.10). Die Plasmide wurden anschließend mit Hilfe des „Plasmid Mini Kits“ (QIAGEN, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers extrahiert.

3.12 Restriktionsanalyse der Plasmide

Zur Überprüfung, ob die präparierten Plasmide (s.u.) das gewünschte Fragment enthielten, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden 100 ng DNA aus der Minipräparation mit 5 U des Restriktionsenzymes *Hind*III (pH5ΔPRT-pol) bzw. 2 U *Apa*I (pBSSK⁺-pol) zusammen mit 0,1 mM Spermidin (Sigma, Deisenhofen) in dem vom Hersteller (MBI Fermentas) empfohlenen Puffer für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (10 µl Ansatz). Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 3.4) aufgetrennt und das Restriktionsmuster ausgewertet.

3.13 Herstellung von Virusstocks durch Transfektionen von adhärennten Zellen

Bei der Transfektion mit Superfect[®] (QIAGEN, Hilden) wird die DNA von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. Das Superfect-Reagenz besteht aus Polyamiden, die eine positive Gesamtladung aufweisen. Diese binden die negativ geladene DNA zu kompakten, leicht

positiv geladenen Strukturen von ca. 7 nm Durchmesser, die an die negativ geladene Zelloberfläche binden und endocytiert werden.

293T-Zellen (DuBridge *et al.* 1987) wurden in „Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalen Kälberserum (FKS) und 2 mM Glutamin (Gln) kultiviert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät (5-8 x10⁵ Zellen/cm²). Pro Transfektion wurden jeweils 2,5 µg Plasmid-DNA und 2,5 µg Träger-DNA pBSSK⁺ in 150 µl DMEM ohne Zusätze aufgenommen, mit 30 µl Superfect gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit 1 ml DMEM mit Zusätzen (FKS, Gln) versetzt und auf die mit PBS (ohne Mg²⁺) gewaschenen 293T-Zellen getropft. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 8 ml DMEM mit Zusätzen bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank kultiviert. Nach 46-48 Stunden wurden die virushaltigen Überstände abgenommen, bei 300 x g zentrifugiert und aliquotiert bei -70°C gelagert.

PBS

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	4,3	mM
KH ₂ PO ₄	1,47	mM
pH	7,4	

3.14 Quantifizierung der HIV-Vermehrung

3.14.1 Messung der sekretierten Alkalischen Phosphatase (SEAP)

Die luminometrische Bestimmung der SEAP-Aktivität erfolgte aus jeweils 20 µl Zellkulturüberstand HIV-1 infizierter CEMx174-SEAP-Zellen mit dem 'Phophalight[®]'-Kit der Firma Tropix nach Angaben des Herstellers (Bedford, Massachusetts) in weißen 96-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden).

Das Kit enthält ein Chemilumineszenz Substrat (CSPD[®], disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1]decan]-4-yl)phenyl phosphate) für die Alkalische

Phosphatase das durch enzymatische Dephosphorylierung zu einem instabilen Dioxetanion wird, das zerfällt und gleichzeitig Energie in Form von Licht abgibt (Bronstein *et al.* 1994). Diese Lichtemission wurde in einem Plattenluminometer (SpektraFluor Plus[®], Tecan, Crailsheim) in "relativen Licht Einheiten" (RLU) gemessen. In diesem Reporter-Gen-Assay sind die gemessenen RLU direkt proportional zu der Menge der sezernierten alkalischen Phosphatase, die ihrerseits proportional zu der Vermehrungsaktivität des infizierenden Virus ist. Dadurch ermöglicht diese Methode die Quantifizierung von Virusreplikation *in vitro*.

3.14.2 HIV-1-p24-Antigen-Assay

Zur Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens p24 im Zellkulturüberstand infizierter Zellen wurde der „HIV-1-p24-Antigen-Assay“ (Coulter, Krefeld) verwendet. Der Assay basiert auf dem ELISA-Prinzip. Die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte sind mit monoklonalem anti-p24-Antikörper (Maus) beschichtet. Das im positiven Standard oder in der Probe enthaltene p24-Antigen bindet an diesen Antikörper und wird dort von biotinylierten Human-anti-p24-IgG gebunden. In einem weiteren Schritt verbindet sich Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase mit den biotinylierten Antikörpern zu Komplexen. Die Peroxidase katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Bildung eines blauen Farbstoffs aus dem Substrat Tetramethylbenzidin. Dieser Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 620 nm (Referenz 450 nm) photometrisch detektiert, wobei die Intensität ein direktes Maß für die Menge des in der Probe enthaltenen ungebundenen p24-Antigens darstellt.

Von den zu untersuchenden Proben wurden Verdünnungsreihen in Zellkulturmedium angefertigt. Der im Kit enthaltene p24-Standard wurde mit Zellkulturmedium auf 8/16/32/63/125/625 pg/ml eingestellt und der Assay nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anhand der Standardkurve wurde, unter Berücksichtigung der Vorverdünnung, die Menge an p24-Antigen in den Proben ermittelt. Die Standardreihe wurde in Doppelbestimmung, die Probenverdünnungen in Einfachbestimmungen gemessen. Alle Proben, die zu einem Experiment gehörten, wurden grundsätzlich parallel in einer Testplatte bestimmt.

3.14.3 Bestimmung des Virustiters

Der Titer an infektiösem Virus wurde in Gewebekultur infektiösen Einheiten (TCID₅₀) bestimmt. Diese Größe gibt den Kehrwert einer Virusverdünnung an, die 50% der Zellen der verwendeten Kulturen infiziert. Als Nachweis der Infektion diente die virusinduzierte Bildung von Riesenzellen (Synzytien) in CEMx174-SEAP Zellen.

Die Zellen wurden mit RPMI 1640-Medium (10% FKS, 2 mM Gln, siehe Kapitel 3.16.2) auf 3×10^4 Zellen/ml eingestellt. Je 800 μ l dieser Zellsuspension wurden in jede Vertiefung einer 24-Loch-Gewebekulturplatte (Nunc, Dänemark) gegeben. Diese Zellen wurden über Nacht in einem Feuchtbrutschrank (Heraeus) gehalten. Von den bei -70°C gelagerten Virussuspensionen wurde, nach dem raschen Auftauen, eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 in Zellkulturmedium angefertigt. Je 200 μ l dieser Virussuspensionen wurden zur Infektion von je 800 μ l Zellsuspension verwendet. Als Zellkontrolle diente virusfreie Zellsuspension.

Die Platten wurden im Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert und nach drei Tagen wurde 1 ml Zellkulturmedium in jede Vertiefung gegeben. Nach weiteren drei Tagen wurden die Kulturen durch Entfernen von 1 ml Zellkultur und Zugabe von 1 ml frischem Medium 1:2 verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt wurde am zehnten Tag wiederholt. 14 Tage nach Infektion der Zellen wurden 1,5 ml Zellsuspension entfernt und die übrigen Zellen mit je 0,5 ml frischem Medium versetzt. Die Virustitration wurde nach 17 Tagen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurden Kulturen mit eindeutiger Synzytienbildung als infiziert gewertet. Die TCID_{50} -Titer wurden nach der Formel von Kaerber und Spearman (Kaerber 1931; Reed *et al.* 1938) berechnet.

$$\text{Titer/ml} = D^{(n/p + 0,5)} / D_0 \cdot D \cdot V \cdot [\text{ml}]$$

D : Basis der Verdünnungsreihe
 D₀ : erste Verdünnung
 p : Anzahl Parallelbestimmungen
 V : eingesetztes Volumen Virussuspension
 n : Anzahl der positiven Proben

3.14.4 *env*-TaqMan-PCR

Mit Hilfe der TaqMan-PCR ist ein spezifischer und quantitativer Nachweis von Zielsequenzen möglich. Die Amplifizierung und der Nachweis des PCR-Produktes erfolgt simultan in einem Reaktionsgefäß unter Ausnutzung der $5' \rightarrow 3'$ -Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase (Holland *et al.* 1991).

In die PCR wird eine spezielle Sonde eingesetzt, die aus einem der Zielsequenz komplementären Oligonukleotid - lokalisiert zwischen den beiden Primern - besteht, dessen $5'$ -Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) markiert ist und dessen $3'$ -Ende sowohl einen Quencher Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt (Livak *et al.* 1995) als auch durch einen Phosphatrest blockiert ist, so dass die Sonde nicht als Primer für die Polymerase fungieren kann. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm)

angeregt, so wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) unterdrückt. Nachdem die Sonde mit den Primern an den Matrizenstrang hybridisiert ist, wird sie in der Elongationsphase von der Taq-Polymerase verdrängt. Dabei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, die die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert, so dass die Sonde geschnitten wird, wodurch die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher und somit der FET aufgehoben wird. Die Emission des Reporters, die direkt gemessen werden kann, steigt entsprechend der Akkumulierung des PCR-Produkts an, da für jedes einzelne synthetisierte Molekül ein spezifisches Signal erzeugt wird.

Die PCR wurde mit dem ABI PRISMTM-7700-Sequenznachweissystem quantitativ und in Echtzeit durchgeführt. Das in dem Gerät enthaltene Detektionssystem erfasst die Veränderungen der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe durch den Deckel des geschlossenen Reaktionsgefäßes Zyklus für Zyklus parallel zur PCR. Es ist möglich mit diesem System gleichzeitig in bis zu 96 Proben die Amplifikation der PCR-Produkte zu detektieren, die Daten stehen nach Abschluss des thermischen Zyklus zur Verfügung. Das 7700-System arbeitet über einen breiten dynamischen Bereich von fünf Größenordnungen linear.

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch PCR-Produkte wurde die TaqMan-PCR mit dUTP an Stelle von dTTP durchgeführt. Dem Ansatz wurde Uracil-N-Glykosylase (UNG) zugefügt, das die glykosidische Bindung zwischen Uracil und Desoxyribose spaltet, so dass eventuelle Kontaminationen mit PCR-Produkten, die Uridin anstelle von Thymidin enthalten, eliminiert werden. Vor der eigentlichen PCR wurde der Reaktionsmix mit diesem Enzym für fünf Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die UNG bei 94°C inaktiviert (*carry over prevention*).

Über die ersten zehn Zyklen der TaqMan-PCR, in denen noch keine nennenswerten Produktmengen zu detektieren sind, wurde eine Basislinie ermittelt und deren Zehnfaches als Schwellenwert (*Threshold*) definiert. Da die Anzahl der Zyklen, die bis zum Überschreiten des Schwellenwertes benötigt werden (ct-Werte) direkt proportional zur Anzahl der Anfangskopien in der Probe sind, kann durch einen Vergleich mit Proben bekannter Konzentration die Kopienzahl einer Zielsequenz in der Ausgangslösung ermittelt werden.

Tabelle 12: Verwendete Primer* und Sonde für die *env*-TaqMan-PCR

env sense SK 68i (nt 7381-7408)*	5'-ggA RCA gCI ggA AgC ACI ATg g
env revers SK 69i2 (nt 7538-7511)*	5'-TTM Atg CCC CAg ACI gTI AgT TIC AAC A
Env-Sonde	5'-6FAM-TgA CgC TgA Cgg TAC Agg CCA gAC APH

* Cassol *et al.* 1991; Koordinaten HIV HxB2 EMBL-Datenbankeintrag AX283583

Tabelle 13: *env*-TaqMan-PCR Ansatz

Reagenz	Konz. final
cDNA	5,0 – 15,0 µl
Rox-Puffer 10x	1x
dN _U TP	je 400 µM
MgCl ₂	3,5 mM
sense Primer	0,6 µM
reverse Primer	0,6 µM
Sonde	100 nM
UNG	0,5 U
Taq-DNA-Polymerase	1,25 U
H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 14: *env*-TaqMan-PCR-Bedingungen

	Hydrolyse (UNG)	5 Minuten	50°C
	Inaktivierung UNG/Denaturierung Probe	7 Minuten	94°C
45 Zyklen	Denaturierung	30 Sekunden	94°C
	Hybridisierung und Elongation	1 Minute	55°C

3.15 Nachweis der Reverse Transkriptase-Aktivität mit dem TaqMan-RT-Test

Das Prinzip des Testes zum Nachweis der Reversen Transkriptase-Aktivität beruht auf der Fähigkeit des nachzuweisenden Enzyms RNA in cDNA zu transkribieren. Die Quantifizierung der gemessenen Aktivität erfolgt im Anschluß an die cDNA-Synthese durch eine TaqMan-PCR (siehe Kapitel 3.14.4) (Böni *et al.* 1996, Arnold *et al.* 1998).

3.15.1 Partikelpräparation

Zur Abtrennung von Zelltrümmern wird der Kulturüberstand (Virusstock) zunächst für 10 Minuten bei 14.000 UpM und 4°C zentrifugiert und das Filtrat anschließend durch einen 0,2 µm Filter (Nalgene) in Beckman "centrifuge tubes", Polyallomer, ½"x2" filtriert. Nachdem das Filtrat mit 10 mM Tris/HCl (RNase frei) auf 5 ml aufgefüllt wurde, folgte ein Ultrazentrifugationsschritt: Rotor TST 54, 70.000 x g, 1,5 Stunden, 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 30 µl Lysis Puffer resuspendiert.

Lysis-Puffer

Promega Cell Culture Lysis Buffer 5x	6 µl
10 mM Tris/HCl (RNase frei)	23,25 µl
RNasin (Promega 40 U/µl)	0,75 µl

3.15.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurden 0,3 µg Phagen MS2-RNA, 1,0 µl MS2-R-Primer (10 µM), 0,4 µl dNTP (25 mM) und zur Unterdrückung der RT-Aktivität von RNasin und der Taq-Polymerase 0,5 µg Kalbsthymus-DNA ad 10,5 µl H₂O bei 95°C für 2 Minuten und anschließend bei 37°C für 30 Minuten vorinkubiert. Dem Ansatz wurde 0,5 µl RNasin (Promega 40 U/µl), 4,0 µl 5x First Strand Buffer (Gibco/BRL), 2,0 µl 0,1M DTT (Gibco/BRL) und 3,0 µl der 1:100 in 10 mM Tris/HCl verdünnten lysierten Partikelpräparation hinzugegeben und die Synthese der cDNA wurde bei 37°C für 5 Stunden durchgeführt. Nach einem finalen Inkubationsschritt von 7 Minuten bei 95°C wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.15.3 TaqMan-PCR zur Quantifizierung der RT-Aktivität

Tabelle 15: Verwendete Primer und Sonde für die RT-TaqMan-PCR*

MS2-F (10 μ M)	TCC TgC TCA ACT TCC TgT Cga
MS2-R (10 μ M)	CAC Agg TCA ACC CTC CTA ggA ATg
MS2-Sonde (10 μ M)	6FAM-TCT TTA gCg AgA CgC TAC CAT ggC TAXTp

* Arnold *et al.* 1998, MS2-Phagen Genom EMBL-Datenbankeintrag J02467

Tabelle 16: RT-TaqMan-PCR Ansatz

Reagenz	Konz. final
cDNA	10 μ l
UMMix	6,25 μ l
MS2-F	0,25 μ M
MS2-R	0,25 μ M
Sonde	0,25 μ M
H ₂ O	ad 25 μ l

Tabelle 17: RT-TaqMan-PCR-Bedingungen

	Hydrolyse (UNG)	2 Minuten	50°C
	Inaktivierung UNG/Denaturierung Probe	10 Minuten	95°C
45 Zyklen	Denaturierung	20 Sekunden	94°C
	Hybridisierung und Elongation	1 Minute	64°C

3.16 Kultur humaner Zelllinien

3.16.1 Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen

Zum Lagern der Zelllinien wurden diese in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium (90 % hitzebehandeltes fötales Kälberseum, 10 % DMSO) aufgenommen und in verschraubbaren Plastikröhrchen (Nunc, Dänemark) aliquotiert. Die Aliquots wurden in Zellstoff und Styropor verpackt und bei -70°C langsam eingefroren. Nach mindestens 16 Stunden Lagerung bei -70°C wurden die Röhrchen in Stickstofflagertanks überführt (Lagerung über flüssigem Stickstoff).

Die Reaktivierung der eingefrorenen Zellen erfolgte durch rasches Auftauen im 37°C warmen Wasserbad. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 10 ml des entsprechenden Mediums (siehe Kapitel 3.16.2) versetzt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei $100 \times g$ wurden sie in dem entsprechenden Medium aufgenommen und auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. An drei darauf folgenden Tagen erfolgte täglich ein Mediumwechsel, indem die Zellsuspension bei $100 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem entsprechenden Medium resuspendiert wurde.

3.16.2 Zellpflege

Humane Zellen wurden je nach benötigter Zellzahl in 50 ml (25 cm^2) oder 260 ml (75 cm^2) Zellkulturflaschen (Nunc, Dänemark) bei 37°C , 90 % Luftfeuchtigkeit und einer CO_2 -Konzentration von 5 % in einem Feuchtbrutschrank (Heraeus) kultiviert. Fötales Kälberserum wurde grundsätzlich hitzebehandelt (56°C , 30 Minuten).

Suspensionszellen (CEMx174 und CEMx174-SEAP) wurden in RPMI 1640, adhärenente Zellen (293T) in DMEM kultiviert. Den Medien wurde 10 % hitzeinaktiviertes FKS und 2 mM Glutamin zugesetzt. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage je nach Konfluenz im Verhältnis 1/5 bis 1/10 umgesetzt. Adhärenente Zellen wurden dabei einmal mit 2 ml bzw. 5 ml Trypsin/EDTA gewaschen und danach bei Raumtemperatur mit 0,5 ml bzw. 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden (25 cm^2 bzw. 75 cm^2) ablösten. Die abgelösten Zellen wurden mit DMEM auf ein definiertes Volumen eingestellt und 1/5 oder 1/10 in eine neue Flasche überführt, auf 5 ml bzw. 15 ml mit frischen Medium aufgefüllt und weiter kultiviert.

3.16.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Zellzählapparatur Easy Count 1 (Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einem definierten Volumen Medium aufgenommen und 1 µl dieser Zellsuspension in 10 ml Easy Count Puffer gegeben und nach Vorschrift des Herstellers ausgezählt.

3.16.4 Mykoplasmen Test

Bevor die Zellen kryokonserviert wurden, wurden sie grundsätzlich auf Kontamination durch Mykoplasmen getestet (van Kuppeveld *et al.* 1993). Dazu wurden 100 µl Zellkulturüberstand für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend 1:10 mit H₂O verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine PCR-Reaktion mit 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, je 1 µM GPO-3-Primer und MGSO-Primer, 0,02 U Taq-DNA-Polymerase in 50 µl Taq-Polymerase-Puffer (InVitek, Berlin) eingesetzt (Zyklusbedingungen siehe Tabelle 18). Als positive Kontrolle diente Kulturüberstand einer mit Mykoplasmen infizierten Zellkultur. Die Proben wurden im Anschluß gelelektrophoretisch analysiert. Als nicht kontaminiert galten diejenigen Kulturüberstände, die zu keiner sichtbaren Bande auf dem Gel führten.

Tabelle 18: Zyklusbedingungen der Mykoplasmen-PCR

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
5 Minuten	94°C	1 x
3 Minuten	72°C	
45 Sekunden	94°C	
45 Sekunden	55°C	
3 Minuten	72 °C	25 x
45 Sekunden	94 °C	
45 Sekunden	55 °C	
10 Minuten	72°C	1 x
10 Minuten	27°C	

Tabelle 19: van-Kuppeveld Primer

GPO-3	5'-ggg AgC AAA Cag gAT Tag ATA ccc T
MGSO	5'-TgC ACC ATC TgT CAC TCT gTT AAC CTC

(van Kuppeveld *et al.* 1993)

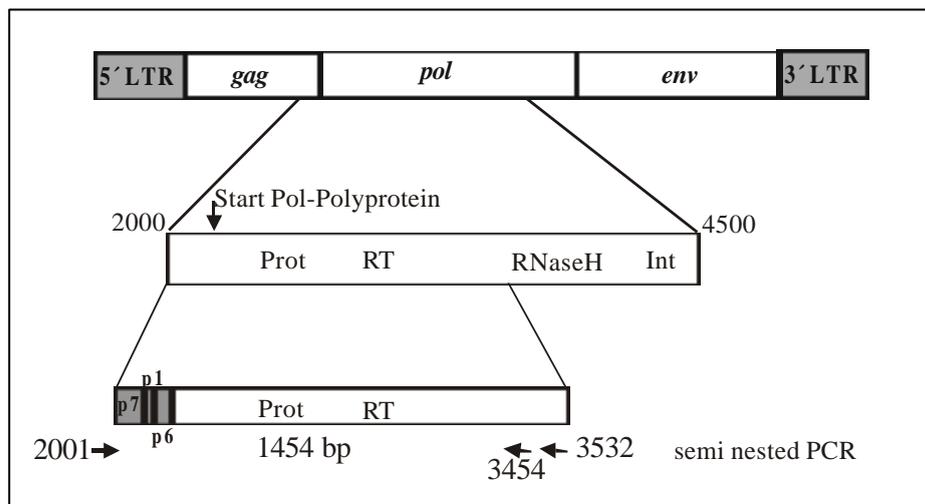
3.17 Genotypische Resistenzbestimmung

Je 20 ml EDTA-Blut HIV-1 infizierter Serokonverter wurden zunächst zur Abtrennung des Plasmas bei 2000 x g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert und die virale RNA wie in Kapitel 3.1 beschrieben, extrahiert und mit einem spezifischen Primer revers transkribiert.

In einer semi-nested RT PCR wurde ein 1,4 kb langes *pol*-Fragment amplifiziert (siehe Kapitel 3.1, 3.3 und Abbildung 5). Jeweils 3 µl des PCR-Ansatzes wurden in einem 1%igen Agarosegel zusammen mit einem Grössenstandard (1 kb Leiter, Gibco/BRL) wie in Kapitel 3.6 beschrieben elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Ansätze wurden von überschüssigen Oligonukleotiden und dNTPs mit dem „PCR Purification“ Kit bzw. bei Vorliegen mehrerer Banden mit Hilfe von präparativen Agarose-Gelen gereinigt (siehe Kapitel 3.5). Die DNA-Konzentration wurde gelelektrophoretisch durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Konzentrationsstandard (DNA Low Mass Ladder, MBI Fermentas) quantifiziert (siehe Kapitel 3.6).

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenzen dieser Amplifikate, wurden pro Sequenzreaktion (siehe Kapitel 3.7) 70-100 ng DNA eingesetzt und mit sieben Primern sequenziert (siehe Abbildung 5). Aus diesen Einzelsequenzen wurde mit Hilfe von Computerprogrammen (Autoassembler bzw. HIV Genotyping, AB Biosystem) eine Consensus-Sequenz erstellt, die die *pol*-Region von nt 2001 bis nt 3454 des viralen Genoms enthält.

Diese Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des genetischen Codes (siehe Anhang) in die Aminosäuresequenz translatiert. Zur Identifizierung der resistenz-assoziierten Mutationen wurden publizierte Daten und Resistenzdatenbanken verwendet (Los Alamos Retrovirusdatenbank <http://hiv-web.lanl.gov>; Stanford Resistance Database <http://www.hivdb.stanford.edu>; Schinazi *et al.* 2000, Peiperl *et al.* 2001).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der semi nested RT-PCR des *pol*-Fragmentes

3.18 Phänotypische Resistenzbestimmung

Zur phänotypischen Resistenzbestimmung wurde zunächst das zu untersuchende HIV-1 *pol*-Fragment durch semi nested RT-PCR amplifiziert und der PCR-Ansatz mit dem PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt und mit Gelelektrophorese quantifiziert (siehe Kapitel 3.3, 3.5 und 3.6).

Das Fragment wurde in den Deletionsvektor p Δ 5PRT ligiert und der Ligationsansatz in ultrakompetente *E. coli* XL2 transformiert (siehe Kapitel 3.10). Mit den erhaltenen p Δ PRT-*pol*-Plasmiden wurden durch Transfektion in 293T-Zellen rekombinante Virusstocks hergestellt (siehe Kapitel 3.13), die zur Ermittlung einer standardisierten Infektionsdosis titriert, indem 25.000 CEMx174-SEAP Zellen in 200 μ l Gesamtvolumen mit 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 20 μ l der 293T-Virusstocks infiziert wurden. Die Zellen sezernieren nach Infektion mit HIV-1 und erfolgter Expression von HIV-1 Tat Alkalische Phosphatase (SEAP) in den Zellkulturüberstand (siehe Kapitel 2.2). Nach 3 Tagen Inkubation der infizierten Zellen bei 37°C im Feuchtinkubator wurde in jeweils 20 μ l Zellkulturüberstand die SEAP-Aktivität lumineszimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.14.1). Die Infektionsdosis, die nach 3 Tagen zu 10.000 RLU (*relative light units*) in 20 μ l Überstand der CEMx174-SEAP-Kulturen führte, wurde im anschließenden Resistenztest eingesetzt.

Für diesen Test wurden die antiretroviralen Medikamente in aufsteigenden Konzentrationen pro 100 μ l in 96-well-Mikrotiterplatten vorgelegt: für AZT, 3TC, NVP, DLV, IDV, RTV NFV jeweils 0 / 0,02 / 0,2 / 2 / 20 μ M; für ddC, ddI, d4T und SQV jeweils 0 / 0,02 / 0,06 / 0,2 / 0,6 / 2 / 6,6 / 20 mM. Für die nukleosidanaloge RT-Inhibitoren wurden

jeweils 25.000 CEMx174-SEAP-Zellen, für die NNRTI und die Proteaseinhibitoren 12.500 CEMx174-SEAP-Zellen in 50 µl RPMI1640-Medium zu den Medikamenten pipettiert und für zwei Stunden bei 37°C im Feuchtinkubator inkubiert. Anschließend wurde für die NRTI die 10.000 RLU entsprechende Infektionsdosis, für die NNRTI und PI 1/5 dieser Dosis in 50 µl RPMI1640-Medium verdünnt.

Die mit Medikamenten vorinkubierten Zellen wurden jeweils im dreifachen Ansatz infiziert und bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit für 3 Tage (NRTI), 4 Tage (IDV, SQV) bzw. 5 Tage (RTV, NFV, NNRTI) inkubiert. Zum Vergleich wurde für jedes Medikament rekombinantes, nicht resistentes Virus (NL4.3) mitgeführt. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität aller Kulturen wie in Kapitel 3.14.1 beschrieben luminometrisch bestimmt.

Zur Ermittlung der Resistenzfaktoren wurden die Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen errechnet und diejenige Wirkstoffkonzentration, die einer Inhibition um 50% der SEAP-Aktivität entsprach (inhibitorische Konzentration 50% = IC₅₀) ermittelt. Zur Bestimmung des Resistenzfaktors eines Virusstocks wurde die IC₅₀ des Virusstocks durch die IC₅₀ des Referenzvirus NL4.3 dividiert.

3.19 Wachstumskinetik einer HIV-Infektion

Mit HIV-1 Virusstocks aus 293T-Zellen (siehe Kapitel 3.13) wurden jeweils $1,75 \times 10^7$ CEMx174-SEAP Zellen in 10 ml RPMI1640-Suspensionskultur in verschiedenen infektiösen Dosen (m.o.i. 0,1 und m.o.i.0,01) infiziert. Nachdem die Viren auf die Zellen gegeben waren, wurden die Suspensionen zwei Stunden im Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert, anschließend mit je 40 ml RPMI1640-Medium aufgefüllt und bei 100 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 50 ml RPMI1640-Medium resuspendiert und rezentrifugiert. Anschließend wurde eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ /ml RPMI1640-Medium eingestellt und die Suspensionen à 1 ml in 24-Loch-Platten (Nunc) gegeben.

In ca. zwölfstündigen Abständen wurde in den folgenden 85 Stunden von jedem der 12 Infektionsansätze je 1 ml aus den im Feuchtbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubierten Platten entfernt und bei 100 x g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden auf Eis à 200 µl aliquotiert und bei -20°C und -70°C gelagert.