

4 Ergebnisse

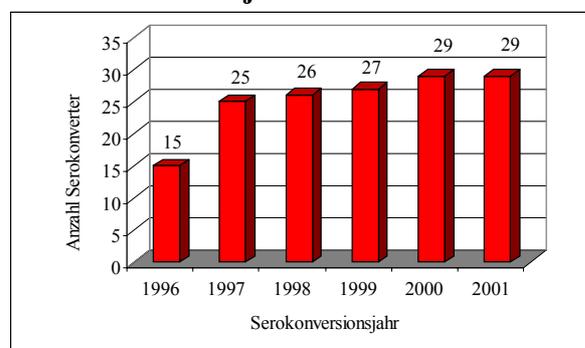
4.1 Übertragung resistenter HIV-1

Seit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1996 wurden in der Behandlung der HIV-Infektion beträchtliche Erfolge bezüglich der Lebenserwartung und Lebensqualität der Infizierten erzielt, wie auch an den sinkenden Aids-Fallzahlen abzulesen ist (UNAIDS 2001). Bei mehr als der Hälfte aller therapierten Patienten kommt es jedoch im Lauf von Monaten bis Jahren zu einem Wiederanstieg der Viruslast (Van Vaerenbergh *et al.* 2002), meist verursacht durch therapie-resistente Viren, die durch Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen Reverse Transkriptase und Protease entstehen und unter Medikation einen Wachstumsvorteil gegenüber den sensitiven Virusstämmen besitzen. Diese resistenten Viren liegen entweder vor Beginn der Therapie vor, oder entstehen bei unvollständiger Inhibition der Replikation während der Therapie. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst die Übertragung und Ausbreitungsdynamik dieser resistenten Viren in der Population der HIV-Positiven zu untersuchen.

4.1.1 Geografische Herkunft der Patienten und Häufigkeit verschiedener Übertragungsrisiken im Studienkollektiv

Bis zum 31.12.2001 konnten im Rahmen der HIV-Serokonverterstudie (siehe Kapitel 2.1) des Robert Koch-Instituts von 151 HIV-Infizierten mit dokumentierter Serokonversion zwischen 1997 und 2001 EDTA-Blutproben vor Beginn einer antiretroviralen Therapie (therapie-naiv) erhalten werden (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: Anzahl therapie-naiver Patienten in Abhängigkeit des Serokonversionsjahres



Serokonversionsjahr: arithmetisches Mittel zwischen dem letzten negativen HIV-Antikörpertest und dem ersten positiven HIV-Infektionsnachweis

Die Proben stammten von insgesamt 16 Einsendern aus 11 deutschen Städten (siehe Anhang), wobei 124 PatientInnen aus Berlin kamen. Die meisten der 151 HIV-Infektionen wurden durch homosexuelle Kontakte übertragen (91%). Neun PatientInnen (6%) gaben als Infektionsrisiko heterosexuelle Kontakte, vier (3%) intravenösen Drogengebrauch (IVDA) an. 147 PatientInnen infizierten sich in Deutschland, jeweils eine Infektion stammte aus den Niederlanden, Thailand, Mosambique bzw. Gambia.

4.1.2 Anteil akuter Infektionen unter therapie-naiven Serokonvertlern

Da im therapie-naiven Patienten der Selektionsdruck durch die Medikamente wegfällt, besteht die Möglichkeit, dass die übertragenen und ursprünglich resistenten Viren vom sensitiven Wildtypvirus überwachsen werden. Deshalb ist es wesentlich, die Resistenzbestimmung möglichst nah am Zeitpunkt der Infektion durchzuführen. Bei 78/151 (52%) der therapie-naiven PatientInnen beträgt die Differenz zwischen dem Datum der Serokonversion und dem der Blutabnahme \leq drei Monate. Von 49 dieser PatientInnen konnte eine Blutprobe während der akuten Infektion, noch vor der Serokonversion erhalten werden (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Differenz zwischen dem Datum der Serokonversion (ConDat) und dem Datum der Blutabnahme (BlutDat)

Δ BlutDat-ConDat (Monate)	Anzahl	Infektionen (%)
0 (akute Infektion vor SK)	49	32
1 bis 3	29	19
4 bis 6	25	16
7 bis 12	25	16
13 bis 24	24	16
über 24	1	4

4.1.3 Amplifizierung und Sequenzierung des HIV *pol*-Fragments

Von 151 eingegangenen EDTA-Blutproben therapie-naiver Serokonverter wurden bis zum Stichtag (31.12.2001, longitudinale Studie) 143 Proben zur Resistenzbestimmung eingesetzt. Dazu wurde ein 1,4 kb großes HIV *pol*-Fragment, das die *gag/pol*-Schnittstelle, die Protease und die ersten 300 von 439 Aminosäuren der Reversen Transkriptase codiert, mit einer semi nested RT-PCR amplifiziert (siehe Kapitel 3.3).

In vier Fällen ergab die PCR ein negatives Ergebnis. Drei der Blutproben, aus denen keine RNA transkribiert und amplifiziert werden konnte, wiesen eine niedrige Viruslast auf (<50 geq/ml). Der Nachweis von viraler RNA war in diesen Proben durch weitere PCR-Methoden ebenfalls nicht möglich (C2V5*env*-PCR). Die vierte, nicht amplifizierbare Probe enthielt Viren vom HIV-1 Subtyp C (C2V3*env*-Analyse). Es ist daher anzunehmen, dass die verwendeten Primer die Matrize nicht erkannten und daher kein ausreichendes Primerannealing stattfand.

Insgesamt war die verwendete RT-PCR gut reproduzierbar und ausreichend sensitiv. Die Nukleinsäuresequenz der amplifizierten Fragmente wurde wie in Kapitel 3.7 beschrieben ermittelt. Von drei der 139 Amplifikate konnte keine Consensus-Sequenz der Quasispezies erstellt werden. Hier lagen Mischungen aus Virusvarianten vor, die nur durch Klonierungen und anschließende Sequenzierung einzelner Klone analysiert werden können. Insgesamt konnte also von Viren aus 136 therapie-naiven Serokonvertern die Resistenzanalyse durchgeführt werden.

Tabelle 21: RT-PCR und Sequenzierung

	pos	neg	nd	nicht auswertbar*
RT-PCR (n=151)	139	4	8	0
Sequenzierung der RT-PCR positiven Proben	136	0	0	3

* Klonierung erforderlich

4.1.4 Übertragung genotypisch resistenter HIV unter therapie-naiven Serokonvertern

Die genotypische Resistenzanalyse (siehe Kapitel 1.7.1 und 3.17) von 136 HIV-1 Infektionen therapie-naiver PatientInnen mit dokumentierter Serokonversion zeigte, dass von 1996 bis 2001 in Deutschland Viren mit resistenz-assoziierten Mutationen übertragen wurden.

Die meisten dieser Viren gehörten dem HIV-1 Subtyp B an (siehe Kapitel 4.6.2). Für diesen Subtyp sind Polymorphismen an den Positionen L63P, A71T/V, V77I, I93L der viralen Protease und R211K und L214F der Reversen Transkriptase bekannt (<http://hiv-web.lanl.gov>, Schinazi *et al.* 2000). Unter Berücksichtigung dieser natürlichen Polymorphismen zeigten 135 (99%) der untersuchten Viren mindestens einen resistenz-assoziierten Aminosäureaustausch.

Eine Übertragung von Viren mit mindestens einer primären und/oder sekundären Mutation, die mit Resistenz gegen antiretrovirale Wirkstoffe assoziiert ist, fand in 47% (n=64) der untersuchten HIV-1 Infektionen (n=136) statt. Werden Viren mit bereits vorliegenden resistenz-assoziierten Mutationen übertragen, kann eine schnelle Selektion resistenter Viren durch die initiale Therapie der Infektion erfolgen, auch wenn eine phänotypische *in vitro* Resistenz dieser Viren vor Therapiebeginn noch nicht nachweisbar ist.

Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Resistenz gegen NRTI

Bei 14% (n=19) der untersuchten Infektionen erfolgte eine Übertragung von Viren mit Mutationen, die mit Resistenz gegen Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) assoziiert sind (siehe Tabelle 22). 15 dieser Viren zeigten genotypische Resistenz gegen AZT. Bei sechs Viren ist aufgrund der genotypischen Resistenzmuster eine phänotypische Resistenz zu erwarten.

In zehn verschiedenen Viren wurden Aminosäureaustausche identifiziert, die sich an resistenz-assoziierten Positionen des Enzyms befinden, aber nicht die resistenz-vermittelnde Substitution tragen. Das heißt hier wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit eine genotypische Resistenz übertragen, die sich durch den fehlenden Selektionsdruck im therapie-naiven Infizierten weiter verändert hat, so dass weder die Aminosäure wie im Wildtyp, noch die resistenz-assoziierte Mutation vorliegt. Solche Ereignisse wurden von Yerly *et al.* und DeRonde *et al* für Aminosäuresubstitutionen an Codon 215 der RT sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet (Yerly *et al.* 1998, DeRonde *et al.* 1998).

Tabelle 22: Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Resistenz gegen NRTI

Jahr der SK	RKI-Nr.	resistenz-assoziierte Mutation	assoziiert mit Resistenz gegen	Häufigkeit % (Anzahl Viren mit r.a. Mutationen/ Anzahl der Untersuchten)
1996	#98-0244	M184V	3TC	7% (1/15)
1997	98-4263	M41L; L210W, <i>T215S</i>	AZT	20% (5/25)
	98-3539	D67N, K219Q	AZT, ABC	
	98-3309	T215D, L210F	AZT	
	97-4527	M41L, <i>T215D</i>	AZT	
	#99-1408	<i>T69N</i> , K70R , M184V , K219Q	ddC, AZT, 3TC	
1998	99-1167	M41L, <i>T215S</i>	AZT	20% (5/25)
	98-3811	M41L	AZT	
	98-3965	M41L, L210W, <i>T215S</i>	AZT	
	98-4018	K70R	AZT	
	#99-2484	M184V	3TC, ABC	
1999	00-0107	K70R	AZT	15% (4/27)
	#99-2920	M41L, M184V , T215F	3TC, AZT, ABC	
	00-0021	M41L, L210W, <i>T215D</i>	AZT	
	99-2380	<i>V75L</i> , F77L, V118I	MDR, 3TC	
2000	#00-0285	D67N, K70R , T215Y , K219Q	AZT, ABC	8% (2/25)
	00-0271	<i>T69N</i>	ddC	
2001	01-0252	D67N, <i>T215L</i> , K219Q	AZT, ABC	11% (2/19)
	#01-0209	L210W, T215Y	AZT	

phänotypische *in vitro* Resistenz aufgrund des genotypischen Resistenzmusters erwartet

fett: primäre resistenz-assoziierte Mutationen

kursiv: Mutationen an resistenz-assoziierten Positionen

r.a.: resistenz-assoziiert

Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Resistenz gegen NtRTI

Der Aminosäureaustausch K65R, der mit genotypischer Resistenz gegen das Nukleotidanalogue Tenofovir (TDF) assoziiert ist, wurde bei den 136 untersuchten Viren aus therapie-naiven HIV-1 Infizierten nicht gefunden. Jedoch wurden in 15 Infektionen Viren mit Thymidinanalogue assoziierten Mutationen (TAM, siehe Kapitel 1.6.1) übertragen, die Kreuzresistenzen gegen TDF verursachen können.

Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Resistenz gegen NNRTI

Viren mit Mutationen, die mit Resistenz gegen Nicht Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) assoziiert sind, wurden in 6% (n=8) der 136 untersuchten Blutproben beobachtet. Jedes dieser Viren trug je eine mit NNRTI Resistenz assoziierte Mutation. Es wurde kein Virus gefunden, das mehr als eine dieser Mutationen aufwies (siehe Tabelle 23). In einem Fall (99-2484) wurde eine genotypische Resistenz gegen alle NNRTI erwartet.

Tabelle 23: Übertragung von HIV-1 mit genotypischer NNRTI-Resistenz

Jahr der SK	RKI-Nr.	resistenz-assoziierte Mutation	assoziiert mit Resistenz gegen	Häufigkeit % (Anzahl Viren mit r.a. Mutationen/ Anzahl der Untersuchten)
1996	keine	keine	entfällt	entfällt
1997	98-3381	<i>V106I</i>	NVR	8% (2/25)
	98-3386	<i>K103R</i>	NVR, DLV, EFV	
1998	99-1167	<i>K103R</i>	NVR, DLV, EFV	12% (3/25)
	99-1343	V179D	EFV	
	#99-2484	K103N	NVR, DLV, EFV	
1999	00-0998	<i>K103R</i>	NVR, DLV, EFV	4% (1/27)
2000	01-0214	<i>V179I</i> (Subtyp D)	EFV	4% (1/25)
2001	01-0312	<i>V179E</i>	EFV	5% (1/19)

phänotypische *in vitro* Resistenz aufgrund des genotypischen Resistenzmusters erwartet

fett: primäre resistenz-assoziierte Mutationen

kursiv: Mutationen an resistenz-assoziierten Positionen

r.a.: resistenz-assoziiert

Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Resistenz gegen Proteaseinhibitoren

48 der 136 (35%) untersuchten HIV-1 trugen mindestens eine mit Resistenz gegen Protease-Inhibitoren (PI) assoziierte Substitution in den 99 Aminosäuren der viralen Protease (siehe Tabellen 24a und 24b). Am häufigsten wurden Viren mit den PI Resistenz assoziierten Mutationen L10I und M36I übertragen, in 7 Fällen lagen beide Mutationen in einem Virus vor. Es ist bekannt, dass das Vorhandensein dieser beiden Mutationen unter Therapie eine schnellere Resistenzentwicklung begünstigt (Perno *et al.* 2001).

Tabelle 24a: Übertragung von HIV-1 mit genotypischer PI-Resistenz (1996-1998)

Jahr der SK	RKI-Nr.	resistenz-assoziierte Mutation	assoziiert mit Resistenz gegen	Häufigkeit % (Anzahl Viren mit r.a. Mutationen/ Anzahl der Untersuchten)
1996	98-3523 98-3383 98-3394	M36I	RTV, IDV, NFV	27% (4/15)
	97-5614	M46L	APV, IDV, NFV	
1997	98-3386 99-0164	L10I	alle PI	32% (8/25)
	98-3402	V82L	IDV, RTV, NFV, SQV	
	98-3309 98-3399 98-1895	M36I	RTV, IDV, NFV	
	98-0886	V82I	IDV, RTV, NFV, SQV	
	#99-1408	L10I, K20R, M36I, M46L , I54V, I84V , L90M	alle PI	
1998	99-1509	L10I, M36I, <i>L33V</i>	alle PI	44% (11/25)
	00-0823	K20R, M36I	RTV, IDV, NFV,	
	00-0160 99-1420	M46V	RTV, NFV, APV	
	98-4301 98-4018 98-4264 99-2484	L10I	alle PI	
	99-1343 98-3550	M36I	RTV, IDV, NFV	
	99-0264	<i>L33V</i>	RTV	

phänotypische *in vitro* Resistenz aufgrund des genotypischen Resistenzmusters erwartet

fett: primäre resistenz-assoziierte Mutationen

kursiv: Mutationen an resistenz-assoziierten Positionen

r.a.: resistenz-assoziiert

Tabelle 24b: Übertragung von HIV-1 mit genotypischer PI-Resistenz (1999-2001)

Jahr der SK	RKI-Nr.	resistenz-assoziierte Mutation	assoziiert mit Resistenz gegen	Häufigkeit % (Anzahl Viren mit r.a. Mutationen/ Anzahl der Untersuchten)
1999	99-0398 00-0251 00-0021	L10I, M36I	alle PI	26% (7/27)
	#00-0107	L10I, I54V, V82A	alle PI	
	00-0161	M36I/V	RTV, IDV, NFV	
	00-0278	M36I	RTV, IDV,NFV	
	99-1450	L10I	alle PI	
2000	00-0834	<i>L10V</i>	alle PI	44% (11/25)
	01-0001	K20R	RTV, IDV	
	01-0214	M36I Subtyp D	RTV, IDV, NFV	
	00-0252	L10I, K20R	alle PI	
	00-0279	M36I	RTV, IDV, NFV	
	00-0795	<i>L33I</i>	RTV	
	#00-0285	G48V , I54V, V82A , I84V	alle PI	
	00-0832 00-0834 01-0021	L10I	alle PI	
00-0005	L10I, M36V	alle PI		
2001	01-0312 01-0199 01-0277 01-0222	M36I	RTV, IDV, NFV	37% (7/19)
	#01-0252	L90M	alle PI	
	01-0005	L10I, K20R	alle PI	
	01-0209	L10I, <i>K20I</i> , M36I	alle PI	

phänotypische *in vitro* Resistenz aufgrund des genotypischen Resistenzmusters erwartet**fett**: primäre resistenz-assoziierte Mutationen*kursiv*: Mutationen an resistenz-assoziierten Positionen

r.a.: resistenz-assoziiert

Wie bereits in Kapitel 1.6.3 beschrieben, sind in HIV-1 non-B Subtypen resistenz-assoziierte Mutationen häufig. Die in Probe 01-0214 detektierte Aminosäuresubstitution M36I ist auf die Zugehörigkeit des Virus zum HIV-1 Subtyp D zurückzuführen. In diesem Fall handelt es sich daher wahrscheinlich nicht um Viren mit resistenz-assoziierten Mutationen, die vor dem Transmissionsereignis durch Therapie selektioniert wurden. Anhand der genotypischen Resistenzanalyse wurde in vier Fällen eine phänotypische Resistenz der Viren erwartet.

Übertragung von HIV-1 mit genotypischer Multiresistenz

In zehn der untersuchten 136 Infektionen wurden Viren übertragen, die resistenz-assoziierte Mutationen gegen mehrere Wirkstoffklassen enthielten. Davon war in sechs Fällen eine phänotypische Resistenz gegen zwei Wirkstoffklassen zu erwarten (Multiresistenz, siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Übertragung von HIV-1 mit resistenz-assoziierten Mutationen gegen verschiedene Wirkstoffklassen (genotypische Multiresistenz)

Jahr der Serokonversion	RKI-Nr.	Wirkstoffklassen, gegen die Viren mit resistenz-assoziierte Mutationen übertragen wurden
1997	98-3309	NRTI/PI
	#99-1408	NRTI/PI
1998	99-1167	NRTI/NNRTI
	98-4018	NRTI/PI
	#99-2484	NRTI/NNRTI
1999	#00-0107	NRTI/PI
	00-0021	NRTI/PI
2000	#00-0285	NRTI/PI
2001	#01-0209	NRTI/PI
	#01-0252	NRTI/PI

phänotypische *in vitro* Resistenz aufgrund des genotypischen Resistenzmusters erwartet

4.1.5 Überprüfung des *in vitro* Phänotyps von Viren mit vorhergesagten Resistenzeigenschaften

Die genotypische Resistenzanalyse zeigt resistenz-assoziierte Mutationen auf, indem die Aminosäuresequenzen der Viren mit den Sequenzen bekannter resistenter Viren verglichen werden. Anhand dieser genotypischen Resistenzmuster kann, unter Zuhilfenahme von Datenbanken, in denen entsprechende Studienergebnisse zusammengefasst sind, eine Vorhersage des *in vitro* Phänotyps des Virus getroffen werden (siehe Kapitel 1.7.1). In der phänotypischen Resistenzanalyse wird die Vermehrungsfähigkeit der Viren bei steigenden Konzentrationen antiretroviraler Medikamente im Vergleich zum sensitiven Wildtyp untersucht (siehe Kapitel 3.18).

Anhand des genotypischen Resistenzmusters der untersuchten HIV-1 aus therapie-naiven PatientInnen mit dokumentierter Serokonversion, wurden diejenigen Proben ausgewählt, von denen eine phänotypische Resistenz zu erwarten war und zur Kontrolle Proben, die nur natürliche Polymorphismen als resistenz-assoziierte Mutationen enthielten. Die phänotypischen Resistenzuntersuchungen wurden in Kooperation mit dem Nationalen Referenzzentrum für Retroviren in Erlangen von Dr. Barbara Schmidt und Dr. Hauke Walter am Institut für Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Dazu wurde das für die genotypische Resistenzbestimmung amplifizierte und sequenzierte *pol*-Fragment in einen HIV-Deletionsvektor ligiert, dem das entsprechende *pol*-Fragment fehlt. Die Resistenzeigenschaften der rekombinanten HIV wurden *in vitro* in An- und Abwesenheit von antiretroviralen Substanzen untersucht (siehe Kapitel 3.18). In den Tabellen 26 und 27 sind die getesteten Proben zusammen mit den Ergebnissen aus der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalyse in Abhängigkeit von dem Jahr der Serokonversion des Indexpatienten zusammengefasst.

Insgesamt wurden 28 der 136 HIV-1 Serokonverter auf phänotypisch resistente HIV-1 untersucht. Von 25 Proben konnten rekombinante Viren mit dem *pol*-Fragment und dem pHΔ5PRT-Vektor hergestellt werden. Bei drei Proben enthielt das *pol*-Fragment eine Restriktionsschnittstelle eines der zur Klonierung verwendeten Enzyme, so dass von diesen keine rekombinanten Viren hergestellt werden konnten. Für diese Proben (99-1509, 00-0285, 01-0252) wurden die phänotypische Resistenzprofile nur anhand des genotypischen Resistenzmusters mit Hilfe der Stanford Resistenz Datenbank vorhergesagt (<http://stanford.edu>, Drug Resistance Interpretation, β -Version; siehe Kapitel 1.7.1).

Zwischen 1996 und 2001 infizierten sich 11% der therapie-naiven Serokonverter (n=15) mit Viren, die *in vitro* eine Resistenz gegen eine oder mehrere antiretrovirale Substanzen zeigten. Die Resistenz war in den meisten Fällen gegen Reverse Transkriptase Inhibitoren gerichtet (4 NRTI, 2 NNRTI), gegen Protease Inhibitoren (PI) gerichtete Resistenzen wurden in drei

der untersuchten Infektionen identifiziert. Eine Übertragung von Viren mit Resistenz gegen verschiedene Wirkstoffklassen (Multiresistenz) wurde in sechs Fällen festgestellt (2 NRTI/NNRTI, 4 PI/NRTI).

Wie erwartet, führen die für den HIV-1 Subtyp B charakteristischen Polymorphismen L63P, A71T/V und V77I der Protease bzw. R211K und L214F der Reversen Transkriptase nicht zur Ausbildung von phänotypischer Resistenz, wenn keine zusätzlichen primären oder sekundären resistenz-assoziierten Mutation vorliegen.

Probe 98-4264 zeigte wider Erwarten eine schwache Resistenz gegen den Proteaseinhibitor Ritonavir, obwohl hier neben den bekannten Polymorphismen nur die sekundäre Mutation M36I in der viralen Protease vorlag, die zusammen mit L63P und V77I in einer anderen Probe zu keiner *in vitro* Resistenz des Virus führte (98-3394). In diesem Fall betrug die Differenz zwischen der Serokonversion des Patienten und dem Datum der Blutabnahme jedoch 10 Monate, so dass es hier wahrscheinlich erscheint, dass übertragene potentiell resistente HIV von solchen überwachsen wurden, die nur sekundäre Mutationen tragen und effizienter replizieren.

Die Reverse Transkriptase aus der Probe 97-4527 zeigte in der genotypischen Resistenzanalyse nur Mutationen, die mit Resistenz gegen Nukleosidanaloga assoziiert sind (M41L, R211K, L214F, T215D), in der phänotypischen Analyse jedoch wurde eine schwache Resistenz gegen NNRTI nachgewiesen. Desgleichen wurde die in Probe 99-1167 schwache NRTI-Resistenz anhand des gemessenen Genotyps nicht erwartet.

Es ist wahrscheinlich, dass in diesen drei Proben die resistenten Viren als minoritäre Varianten innerhalb der Quasispezies vorliegen. In einer klonalen Analyse der Quasispezies wurde überprüft, ob tatsächlich minoritäre Varianten vorliegen, die zur beobachteten *in vitro* Resistenz geführt haben (siehe Kapitel 4.3). Bei den anderen untersuchten Proben stimmten die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzanalyse mit dem aus der Aminosäuresequenz vorhergesagten Resistenzprofil überein.

Tabelle 26: Phänotypische Analyse rekombinanter HIV-1 mit resistenz-assoziierten Mutationen gegen RTI

Jahr der Serokonversion	RKI-Nr.	NRTI [#]					NNRTI [#]				resistenz-assoziiertes Aminosäureaustausch
		A Z T	d d C	d d I	d 4 T	3 T C	A B C	N V R	D L V	E F V	
1996	98-0244	1	3	2	1	>100	3	1	1	1	M184V; R211K; L214F
1997	98-4263	9	2	1	1	2	1	1	1	1	M41L; L210W; R211K; L214F; T215S
	97-4527	3	3	1	3	3	2	1	5	3	M41L; R211K; L214F; T215D
	98-3539	3	1	1	1	1	1	1	1	1	D67N; R211K; L214F; K219Q
	98-3388	3	1	1	1	1	1	1	2	1	L214F
	98-0950	2	1	1	1	1	1	1	3	5	E138K; R211S; L214F
	99-1408	6	1	1	1	>100	1	1	1	1	T69N, K70R, M184V, R211K, L214F, K219Q
1998	98-4018	1	1	1	1	1	1	1	1	1	K70R; L214F
	98-3811	5	1	1	2	1	1	1	2	1	M41L; R211K; L214F
	99-1167	3	5	5	5	4	2	5	3	3	M41L; K103R; L214F; T215S
	98-3965	7	2	1	2	1	1	3	1	1	M41L; L210W; L214F; T215S
	99-2484	1	nd	2	1	>100	2	92	31	30	K103N, I135T, M184V, R211Q, L214F
1999	99-2920	10	1	3	3	>100	4	1	1	1	M41L, M184V, R211K, L214F, T215F,
	00-0021	3	1	2	3	2	1	2	1	1	M41L, L210W, R211K, L214F, T215D
2000	00-0285*	95	17	17	49	1	40	1	1	1	D67N, K70R, A98S, I135V, L214F, T215Y, K219Q
2001	01-0209	9	nd	1	1	3	1	1	2	1	L210W, R211K, T215Y
	01-0252*	55	7	7	29	1	25	1	1	1	D67N, T215yx, K219Q, L214F

[#]Die Zahlen geben die x-fache 50% inhibitorische Konzentration (IC₅₀) des Wirkstoffs an. Relevante Resistenzen sind fettgedruckt. Die mit * gekennzeichneten Proben wurden nicht *in vitro* gemessen, sondern die phänotypische Resistenz wurde aus dem ermittelten Genotyp vorhergesagt (<http://www.stanford.edu>, Drug Resistance Interpretation, β -Version); nd = not done

Tabelle 27: Phänotypische Analyse rekombinanter HIV-1 mit resistenz-assoziierten Mutationen gegen PI

Jahr der Serokonversion	RKI-Nr.	Protease Inhibitoren [#]					resistenz-assoziiierter Aminosäureaustausch
		IDV	SQV	RTV	NFV	APV	
1996	97-5614	2	2	1	1	1	M46L
	98-3394	2	1	1	3	1	M36I; L63P; V77I
1997	98-0950	1	1	1	1	nd	L63P; A71V;
	98-3388	1	1	1	1	nd	D60E
	98-0886	1	1	1	1	1	L63S; V82I
	98-3386	1	1	2	2	1	L10I; L63P; V77I
	99-0164	2	1	1	3	1	L10I; V77I
	97-4527	3	1	1	2	nd	L63P
	99-1408	54	113	60	40	55	L10I, K20R, M36I, M46L, I54V, A71V, I84V, L90M, I93L
1998	99-1289	2	1	1	1	1	M46V; L63P; A71V; V77I
	98-4264	1	1	6	3	1	M36I; L63P; A71T; V77I
	99-1420	2	1	1	1	1	L10I; L63S
	99-1509*	9	9	9	9	9	L10I, L33V, M36I, L63T, A71T, I93L
	98-4222	1	1	1	2	1	L63P; A71T; V77I
1999	00-0107	5	2	27	9	2	L10I, I54V, L63P, V82A
2000	00-0285*	87	117	87	122	77	G48V, I54V, L63P, A71V, V77I, L90M, I93L
2001	01-0209	15	4	4	20	4	L10I, K20I, M36I, L63S, T74S, I93L
	01-0252*	28	43	28	58	23	L63P, A71V, V77I, L90M, I93L

[#]Die Zahlen geben die x-fache 50% inhibitorische Konzentration (IC₅₀) des Wirkstoffs an. Relevante Resistenzen sind fettgedruckt. Die mit * gekennzeichneten Proben wurden nicht *in vitro* gemessen, sondern die phänotypische Resistenz wurde aus dem ermittelten Genotyp vorhergesagt (<http://www.stanford.edu>, Drug Resistance Interpretation, β -Version)

Die Untersuchung der genotypischen und phänotypischen Resistenzeigenschaften von HIV-1 aus 136 therapie-naiven Serokonvertern ergab, dass bei 47% der Infektionen Viren übertragen wurden, die bereits mindestens eine resistenz-assoziierte Mutation im *pol*-Gen trugen. Diese Mutationen gehörten nicht zu den resistenz-assoziierten subtypspezifischen natürlichen Polymorphismen, sondern wurden sehr wahrscheinlich vor dem Übertragungsereignis in der In-

fektquelle durch eine unvollständige Inhibition der Replikation unter Therapie selektioniert. In 11% der untersuchten Infektionen erfolgte eine Übertragung von Viren, die sich in Anwesenheit antiretroviraler Substanzen *in vitro* vermehren konnten (phänotypische Resistenz).

4.2 Trendanalyse der Übertragungshäufigkeit resistenter HIV-1

Im vorangegangenen Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl genotypisch als auch phänotypisch resistente HIV-1 in frisch infizierten Serokonverttern zu einem nicht unerheblichen Teil übertragen werden. Diese resistenten Viren tragen aufgrund der resistenz-assoziierten Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen das Potential unter Therapie selektioniert zu werden und so zu einem raschen Therapieversagen zu führen. Um den weiteren Verlauf der Epidemie besser einschätzen zu können, ist es von Vorteil zu wissen, ob die Übertragung resistenter HIV-1 seit Einführung der Kombinationstherapie HAART 1996 zugenommen hat.

Dazu wurde zunächst die Anzahl der primären und sekundären resistenz-assoziierten Mutationen der Reversen Transkriptase und der Protease im zeitlichen Verlauf betrachtet. Da eine Normalverteilung in den einzelnen Gruppen nicht angenommen werden kann, wurde zur Trendanalyse der Mutationshäufigkeit der Kruskal-Wallis-Test verwendet, der ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich von unabhängigen Stichproben ist. Die Nullhypothese war in diesem Fall, dass sich die Anzahl der Mutationen in den Jahren nicht unterscheidet. Für die Häufigkeiten der resistenz-assoziierten Mutationen in den Jahren 1996-2001 ergaben sich die in Tabelle 28 aufgeführten mittleren Ränge.

Tabelle 28: Analyse der Mutationshäufigkeiten mit Kruskal-Wallis-Test

Jahr der Serokonversion	Anzahl der Proben	mittlerer Rang	
		Protease	Reverse Transkriptase
1996	15	61,53	59,10
1997	25	66,00	74,72
1998	25	74,16	75,66
1999	27	64,37	68,06
2000	25	75,08	63,14
2001	19	67,05	66,00

Im Kruskal-Wallis-Test war für die Häufigkeit resistenz-assoziiertes primärer und sekundärer Mutationen zwischen den Jahren kein Unterschied zu erkennen ($p_{\text{Protease}}=0,701$; $p_{\text{RT}}=0,318$). Eine messbare Zunahme der Übertragung genotypisch resistenter HIV-1 fand demnach im untersuchten Patientenkollektiv im Untersuchungsraum von 1996-2001 nicht statt.

Die Frage ob die Übertragung phänotypisch resistenter HIV-1 seit Einführung der hochaktiven Kombinationstherapie HAART im Jahr 1996 zugenommen hat, kann aufgrund der kleinen Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. Auffällig ist jedoch ein gehäuftes Auftreten von PI/NRTI resistenten Viren in den letzten Jahren. Tabelle 29 zeigt die Häufigkeit der Transmission phänotypisch resistenter HIV-1 in den jeweiligen Infektionsjahren.

Tabelle 29: Übertragung phänotypisch resistenter HIV-1

Jahr der SK	n	<i>in vitro</i> Resistenz	Resistenz gegen
1996	15	1 NRTI	3TC
1997	25	1 NRTI	AZT
		2 NNRTI	EFV/DLV
		1 PI + NRTI	3TC, AZT, alle PI
1998	25	1 NRTI	AZT
		2 NRTI+NNRTI	3TC, alle NNRTI/ ddC, ddI, d4T; NVR
		2 PI	IDV / RTV
1999	27	1 NRTI	3TC, AZT
		1 PI	RTV, NFV, LPV
2000	25	1 PI + NRTI	AZT, alle PI
2001	19	2 PI + NRTI	ABC, d4T, AZT, alle PI
			AZT, d4T, ddI, ABC, PI

Bei 15 (11%) der 136 (100%) untersuchten HIV-1 Isolate konnte eine phänotypische Resistenz nachgewiesen werden.

4.3 Nachweis minoritärer Virusvarianten

Sowohl bei der genotypischen als auch bei der phänotypischen Resistenzbestimmung wird ein Virusgemisch (Quasispezies) aus der jeweiligen Blutprobe untersucht. Die Nachweisgrenze der Sequenzierungsmethode für minoritäre Virusvarianten, die bei der Genotypisierung in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, beträgt 25% (Larder *et al.* 1993). Das heißt, in der untersuchten Probe muss eine Virusvariante zu mindestens 25% vertreten sein, um detektiert zu werden. In der phänotypischen Resistenzanalyse beträgt die Nachweisgrenze von minoritären Varianten etwa 10% (B. Schmidt, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wird bei der Sequenzierung der HIV-1 *pol*-Fragmente eine Consensus-Sequenz erstellt, so dass es nicht zwingend ist, dass sich die in einer Analyse nachgewiesenen resistenz-assoziierten Mutationen in einem einzelnen Virusgenom befinden. Dies und die unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Methoden zur Resistenzanalyse können zu Diskrepanzen zwischen dem aus der genotypischen Analyse vorhergesagten und dem tatsächlich *in vitro* gemessenen Phänotyp führen.

Bei der Untersuchung von 136 HIV-1 aus therapie-naiven Serokonvertern wurden in drei Fällen solche Diskrepanzen ermittelt (98-4264, 97-4527, 99-1167; siehe Kapitel 4.1.5). Zur Untersuchung dieser Befunde wurden die entsprechenden *pol*-Fragmente wie in Kapitel 3.9 beschrieben mit Hilfe der bei der Amplifizierung eingefügten Restriktionsschnittstellen in den pBSSK⁺-Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 3.10). Pro untersuchter Probe wurden 200-400 Transformanten erhalten, von denen 18 willkürlich ausgesucht wurden. Von diesen wurden in Minipräparationen die Plasmide isoliert (siehe Kapitel 3.11) und eine Restriktionsanalyse durchgeführt (siehe Kapitel 3.12). Zur Detektion der minoritären Virusvarianten, die eventuell für die gemessene phänotypische Resistenz verantwortlich waren, wurden von jeweils 10 Klonen jeder Probe durch Sequenzierung ein genotypisches Resistenzmuster erstellt (siehe Kapitel 3.17). Mit der Sequenzierung von zehn Klonen können statistisch alle Viren erfasst werden, die ca. 10% Anteil in der Quasispezies haben.

Im ersten Fall (98-4264) enthält die Consensus-Sequenz des untersuchten *pol*-Fragmentes in der Protease die mit Ritonavir-, Nelfinavir- und Indinavir-resistenz-assoziierte sekundäre Mutation M36I und zusätzlich, die für den HIV-1 Subtyp B charakteristischen resistenz-assoziierten Polymorphismen L63P, A71T, V77I und I93L. Alle zehn sequenzierten Klone dieser Probe zeigten ein mit der Consensus-Sequenz identisches Resistenzmuster, das heißt, es konnten in der Proteasesequenz der untersuchten Klone keine Mutationen detektiert werden, die die phänotypische RTV Resistenz erklärt hätten.

Die Differenz zwischen dem errechneten Datum der Serokonversion (arithmetisches Mittel zwischen dem letzten negativen und dem ersten positiven HIV-Nachweis) und dem der Blutabnahme betrug bei diesem Patienten zehn Monate. Es ist möglich, dass eventuell übertragene

resistente Viren während dieser Zeit vom Wildtyp überwachsen wurden, in sehr geringer Anzahl aber doch noch vorliegen, und so zur phänotypischen Resistenz beitragen.

Es ist jedoch auch denkbar, dass aufgrund der Wirkmechanismen der Proteaseinhibitoren (kompetitive Hemmung) und der daraus resultierenden Kreuzresistenzen alleine die Anzahl der resistenz-assoziierten Mutationen für die leichte *in vitro* Resistenz verantwortlich war.

Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen von PI-resistenten HIV Varianten, die z.B. durch gerichtete Mutagenese eingeführte resistenz-assoziierte Mutationen enthalten, notwendig. Auch die Beobachtung des klinischen Verlaufs der Infektion des Index-Patienten könnte Aufschluss darüber geben, ob das Vorliegen von mehreren resistenz-assoziierten sekundären Mutationen und Polymorphismen zu einem schnelleren Therapieversagen beiträgt.

Im zweiten Fall enthielt die Consensus-Sequenz der Probe (97-4527) die mit Resistenz gegen NRTI assoziierten sekundären Mutationen M41L, T215D und zusätzlich die Polymorphismen S68G, R211K und L214F. Obwohl die genotypische Resistenzanalyse nur NRTI-assoziierte Aminosäureaustausche detektierte, ergab die phänotypische Untersuchung der Probe eine fünffache *in vitro* Resistenz gegen den nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitor Delavirdin.

Die Analyse von zehn Klonen ergab für sieben Klone ein mit der Consensus-Sequenz identisches Resistenzmuster. Drei der zehn Klone zeigten den Austausch von Lysin durch Arginin an Codon 101 der Reversen Transkriptase (K101R), der eine Erklärung für den phänotypischen Befund sein könnte. In der Literatur als NNRTI resistenz-assoziiert ist jedoch der Austausch von Lysin durch Glutaminsäure beschrieben (K101E, Schinazi *et al.* 2000). Es ist vorstellbar, dass eine Übertragung von HIV mit dieser Mutation erfolgte und während der drei Monate, die in diesem Fall zwischen Serokonversion und Blutabnahme lagen, kompensatorische Rückmutationen erfolgten.

Rekombinante Viren aus der Probe 99-1167 zeigten *in vitro* eine fünffache Resistenz gegen ddI, ddC, d4T, und Nevirapin, vierfache Resistenz gegen 3TC, dreifach gegen DLV, EFV und AZT und eine zweifache Resistenz gegen ABC. Diese Multiresistenz war aufgrund der genotypischen Resistenzanalyse nicht zu erwarten. Die AZT-assoziierten Mutationen M41L und T215S, der Polymorphismus L214F und der NNRTI-assoziierte Aminosäureaustausch K103R deuteten allenfalls auf schwache AZT/NNRTI-Resistenz hin, erklären jedoch nicht den, wenn auch schwachen, multiresistenten Befund der Probe.

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzanalyse deuteten auf den Kreuzresistenz induzierenden Komplex Q151M hin, der in einer minoritären Fraktion der HIV-1 Quasispezies

vorliegen könnte (siehe Kapitel 1.6.1, Q151M plus 62, 75, 77, 116; Iversen *et al.* 1996, Shirasaka *et al.* 1995). Die Sequenzanalyse von zehn Klonen dieser Probe konnte die Vermutung jedoch nicht bestätigen.

Sieben der zehn analysierten Klone zeigten ein mit der Consensus-Sequenz übereinstimmendes Resistenzmuster. In zwei Klonen wurde zusätzlich zu diesen Mutationen in der RT der E44G-Austausch detektiert, der mit Resistenz gegen 3TC assoziiert ist, wenn er zusammen mit AZT-Resistenz vermittelnden Mutationen vorliegt. Ein weiterer Klon zeigte zusätzlich zu den in der Consensus-Sequenz enthaltenen Mutationen in der Reversen Transkriptase die M184V Substitution. Zwei Klone enthielten die mit ddC-, ABC- und 3TC-Resistenz primäre, für ddI-Resistenz sekundäre Mutation M184V. In einem dieser beiden Klone fehlte die M41L Substitution in der RT. Die in jedem fünften Klon der Quasispezies vorhandene M184V Mutation der RT könnte für die schwachen phänotypischen Resistenzen verantwortlich sein. Es ist wahrscheinlich, dass diese fitnessmindernde M184V-Substitution vom Wildtyp überwachsen wurde und deshalb nur noch in minoritären Varianten detektiert werden kann. Klon 09 hatte zusätzlich zu dem in der Consensus-Sequenz detektierten V77I Austausch in der Protease, die mit Resistenz gegen Proteaseinhibitoren assoziierte Aminosäuresubstitutionen L33V und I47V und im *Reverse Transkriptase*-Gen zwei Stopcodons an den Positionen 79 und 252. Diese Defektmutante konnte nicht replizieren und wurde deshalb von infektiösen Varianten schnell überwachsen.

Dieses Beispiel zeigt, dass die genotypische Resistenzanalyse nur einen Hinweis auf resistente Viren gibt, und die Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich in der Quasispezies resistente Varianten befinden, die unter Therapie rasch selektioniert werden. Deshalb ist die schnellere und kostengünstigere genotypische Resistenzanalyse vor dem Beginn einer initialen Therapie nur wirklich sinnvoll, wenn sie möglichst früh nach Infektion, im günstigsten Fall noch vor der Serokonversion des Patienten durchgeführt wird, damit die tatsächlich übertragenen Viren ermittelt werden können.

Im Allgemeinen ist die *in vitro* Resistenz der Viren anhand der resistenz-assoziierten Mutationen recht gut vorhersagbar. In Einzelfällen kann es aufgrund von Kreuzresistenzen oder durch Veränderung der Viruspopulation durch den fehlenden Selektionsdruck im therapie-naiven Patienten oder bei Therapiepausen zu Diskrepanzen zwischen dem erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Phänotyp kommen. Zur Verringerung dieses Problems müssen weitere Studien angefertigt werden, deren Ergebnisse die Genauigkeit der Vorhersagealgorithmen verbessern, wobei letztendliche Sicherheit über die Resistenzeigenschaften der Viren nur die phänotypische Analyse gibt. Die klinische Relevanz der phänotypischen Analyse wird zur Zeit in Studien untersucht. Da in der *in vitro* Analyse Virusfragmente untersucht werden, liefert das Ergebnis einer Resistenzanalyse jedoch nur einen Hinweis auf eventuell bestehende Resistenzen.

4.4 Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit Therapieversagen und bei therapie-naiven Patienten

Zur Untersuchung der Therapierbarkeit von Primärinfektionen mit resistenten HIV, der Selektion resistenter Virusvarianten durch eine Therapie und der evolutionären Veränderung genotypischer Resistenzmuster *in vivo* bei fehlendem Selektionsdruck (nicht-therapierter Patient) konnten im Rahmen der Serokonverterstudie Verlaufsproben (Follow Up) von einigen der untersuchten PatientInnen erhalten werden. Es wurde der Infektionsverlauf von drei Patienten untersucht, bei denen vor Beginn einer Therapie bereits resistente Viren vorlagen und/oder unter Therapie selektioniert wurden. Von einem weiteren Patienten konnten in einem Zeitraum von zwei Jahren insgesamt drei therapie-naive Verlaufsproben erhalten werden.

Im ersten Fall ergab die Untersuchung der ersten Blutprobe (98-3388), die während der Serokonversion des Patienten vor Beginn der Therapie im Januar 1997 zur Verfügung stand, keinen Hinweis auf das Vorliegen resistenter HIV. In der sequenzierten *pol*-Region wurden bis auf die Polymorphismen R211K und L214F keine resistenz-assoziierten Mutationen detektiert. Die Bestimmung der Viruslast und der CD4⁺-Zellzahl, die ebenfalls im Januar 1997 erfolgte, ergaben 756.100 geq/ml (HIV Genomäquivalente/ml) bei 591 CD4⁺/µl. Der Patient wurde mit NRTI, NNRTI und PI in unterschiedlichen Kombinationen behandelt.

In der Verlaufsprobe (98-3403) vom Juni 1998 wurden Viren mit einer Reihe relevanter resistenz-assoziiierter Mutationen festgestellt (Protease: K20R, D30N, M36I, D60E; RT: K103N, Y181C, R211K, L214F). Die Viruslast betrug zu diesem Zeitpunkt 7.000 geq/ml, bei einer CD4⁺-Zellzahl von 601/µl.

Es ist wahrscheinlich, dass unter der Therapie eine Selektion von Viren mit NNRTI-Resistenz erfolgte, die wahrscheinlich zu einer klinischen Unwirksamkeit der NNRTI-Therapie führte. Ausserdem erfolgte eine Selektion PI-resistenter Viren durch RTV, so dass die Virusvermehrung nicht mehr vollständig inhibiert wurde und weitere resistente Viren selektioniert wurden, was schließlich wahrscheinlich zu dem beobachteten Wiederanstieg der Viruslast führte.

In einem zweiten Fall wurden ebenfalls resistente Viren unter Therapie selektioniert, die entweder bereits vor Therapiebeginn als minoritäre Varianten in so geringer Konzentration vorhanden waren, dass sie durch Resistenzanalyse der Quasispezies nicht detektierbar waren, oder unter Therapie *de novo* entstanden sind.

Bei diesem Patienten (98-3394) wurden in der erst untersuchten Probe Viren mit den PI-assoziierten Mutationen und Polymorphismen M36I, L63P und V77I und die Polymorphismen der RT R211K, L214F identifiziert. Eine phänotypische Resistenz der Viren wurde anhand dieses Genotyps nicht erwartet. Aufgrund der recht hohen Viruslast (943.000 geq/ml) wurde bei gutem Immunstatus (520 CD4⁺/μl) eine Therapie mit NRTI, NNRTI und PI eingeleitet.

Eine Follow-Up Probe (98-3404) 24 Monate nach Therapie zeigte Viren mit ausgeprägter Resistenz gegen NNRTI aufgrund der primären Mutationen K103N, V106A und Y181C. Da sich das Resistenzmuster der Protease nicht verändert hatte, ist der Wiederanstieg der Viruslast (28.000 geq/ml; CD4⁺ 599/μl) auf die NNRTI-resistenten Viren zurückzuführen. Aufgrund der vorliegenden Resistenz gegen NNRTI konnte die Dreifachkombinationstherapie nur noch als Doppeltherapie wirksam sein, so dass hier sowohl ein weiterer Anstieg der Viruslast als auch die Selektion resistenter und multiresistenter Viren und letztlich ein vollständiges Therapieversagen wahrscheinlich war. Durch Änderung der Medikamentenkombination könnte der Selektionsdruck auf die NNRTI resistenten Viren wegfallen, so dass diese gegenüber sensitiven Viren keinen Wachstumsvorteil mehr hätten, wodurch kompensatorische Rückmutationen wahrscheinlich würden.

Die Möglichkeit des Resistenzverlustes der Viren bei fehlendem Selektionsdruck, die auch bei strukturierten Therapiepausen (STI) genutzt wird, wurde bei einem dritten Patienten beobachtet.

Die Viren aus einer während der akuten Phase der Infektion entnommenen Blutprobe (00-0285) enthielten zahlreiche primäre und sekundäre resistenz-assoziierte Mutationen (Protease: G48V, I54V, L63P, A71V, V82A, I84V; RT: D67N, K70R, L214F, T215Y, K219Q). Eine Analyse der Viruslast ergab 347.000 geq/ml bei einer CD4⁺-Zellzahl von 291/μl. Die phänotypische Resistenzanalyse mit einem rekombinanten *in vitro* Assay konnte aufgrund einer Restriktionsschnittstelle im *pol*-Fragment der zu untersuchenden HIV nicht durchgeführt werden. Die Interpretation des Mutationsmusters ließ eine *in vitro* Resistenz gegen alle PI und AZT, mit Kreuzresistenzen gegen d4T, ddC, ddI und ABC erwarten.

Der Patient wurde ein Jahr erfolgreich mit ABC, ddI, EFV und HU behandelt und unterbrach aufgrund von Nebenwirkungen im Mai 2001 die Therapie. Die Viruslast betrug drei Monate nach Therapiestop 982.000 geq/ml bei gutem Immunstatus des Patienten (CD4⁺ 550/μl). Gleichzeitig wurden antiretroviral sensitive Viren identifiziert, die in der Protease lediglich die Polymorphismen L63P, I93L und in der Reversen Transkriptase die NNRTI-assoziierte Mutation K101R trugen, die wahrscheinlich unter der initialen EFV-Therapie selektioniert wurden. In diesem Fall wurden die bei der Infektion übertragenen, PI und NRTI resistenten HIV vom Wildtyp überwachsen und die Immunkompetenz des Patienten konnte zumindest quantitativ wiederhergestellt werden (Verdopplung der CD4⁺-Zellzahl).

Nicht immer werden Viren, die resistenz-assoziierte Mutationen tragen, vom Wildtyp überwachsen. Ein Beispiel für die Stabilität sekundärer resistenz-assoziiierter Mutationen und Polymorphismen *in vivo* lieferten Untersuchungen von drei Verlaufsproben (00-0021, 01-0134 und 01-0304), die in einem Zeitraum von nahezu zwei Jahren nach Infektion erhalten wurden. Der Patient wurde während der gesamten Zeit nicht therapiert. Der letzte negative HIV-1 Test des Patienten erfolgte im September 1999, der erste positive HIV-Nachweis zwei Monate später, so dass der Zeitpunkt der Infektion für Oktober 1999 berechnet wurde.

Die erste Blutabnahme erfolgte drei Monate nach Infektion, die untersuchten Viren zeigten ein genotypisches Resistenzmuster (Protease: L10I, M36I, L63S; RT: M41L, R211K, L214F und T215D), das keinen Hinweis auf eine relevante phänotypische Resistenz enthielt. Im Phänotypetest wurde die antiretrovirale Sensitivität der Viren bestätigt.

Vierzehn Monate nach der ersten Blutabnahme wurde eine weitere Blutprobe (01-0134) des therapie-naiven Patienten untersucht. Zusätzlich zu den bereits detektierten resistenz-assoziierten Mutationen wurden die Polymorphismen I93L der Protease und L210W der RT identifiziert.

In einer dritten, sieben Monate nach der zweiten entnommenen Blutprobe wurde ein unverändertes Mutationsmuster detektiert (01-0304). Das heißt, die nach Infektion vorliegenden resistenz-assoziierten Mutationen hatten sich in 22 Monaten *in vivo* nicht verändert. Dies deutet darauf hin, dass die vorliegenden Mutationen keinen Einfluss auf die virale Fitness haben, oder durch kompensatorische Mutationen in anderen nicht resistenz-assoziierten Positionen oder in anderen Genen der Erhalt der *pol*-Mutationen begünstigt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Resistenzentwicklung unter Therapie möglich ist, aber auch, dass bereits resistente Viren durch ein geeignetes Therapieregime in ihrer Replikation gehemmt werden können. Durch Änderung des Selektionsdrucks oder in strukturierten Therapiepausen können bereits resistente Viren vom Wildtyp überwachsen werden, so dass auch bei einem Therapieversagen noch weitere therapeutische Möglichkeiten zur Senkung der wieder angestiegenen Viruslast zur Verfügung stehen. Es ist jedoch auch möglich, dass die resistenten bzw. potentiell resistenten Viren in der Quasispezies erhalten bleiben und gegebenenfalls rasch selektioniert werden können. Welche Mutationen dabei relevant sind, können nur Untersuchungen zur Replikationskompetenz (virale Fitness) resistenter Viren zeigen.

4.5 Mutationen in der *gag/pol*-Schnittstelle resistenter HIV-1

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der Proteaseinhibitoren zu den natürlichen Substraten der HIV-Protease, erkennen resistente Proteasen ihr natürliches Substrat häufig schlechter und führen zu einer gegenüber dem Wildtyp geringeren Vermehrungseffizienz der Viren. Dies kann einerseits durch kompensatorische Mutationen in den resistenten Proteasen (Martinez-Picado *et al.* 1999), aber auch durch Mutationen in den Schnittstellen, dem viralen Substrat der Enzyme, ausgeglichen werden (*gag/pol* p7/p1 Q₃→R₃, A₄→V₄, p1/p6 L₆→F₆; Doyon *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1997; Carrilo *et al.* 1998; Cote *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen von sechs HIV-1 analysiert, die erwartete oder *in vitro* gemessene phänotypische PI-Resistenz zeigten (siehe Kapitel 4.1.5). Zur Untersuchung der Frage, ob diese PI-resistenten Viren eine eventuell verminderte virale Fitness durch Mutationen an der *gag/pol*-Schnittstelle kompensieren, wurden die Aminosäuremuster der *gag* p1/p6 und *gag* p7(NC)/p1 Proteaseschnittstellen analysiert (siehe Kapitel 3.7.1).

In den multiresistenten Viren aus der Probe 00-0285 war der mit Proteaseinhibitor-Resistenz assoziierte Aminosäureaustausch A₄→V₄ in der *gag/pol* p7/p1 Schnittstelle enthalten (siehe Tabelle 30). Da in dem *pol*-Fragment eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *NheI* enthalten war, konnte die virale Fitness dieser Probe nicht untersucht werden.

In den übrigen *gag/pol*-Schnittstellen der PI-resistenten Proteasen aus HIV aus therapie-naiven Serokonvertern wurden keine Mutationen gefunden, von denen angenommen werden konnte, dass sie vor dem Transmissionsereignis durch eine PI-Therapie selektioniert wurden. Die Aminosäureaustausche E₁→D₁ der *gag/pol* p7/p1 Schnittstelle (00-0107) und L₆→P₆ der *gag/pol* p1/p6 Schnittstelle (01-0209) sind in der Literatur nicht als mit resistenten Proteasen assoziiert beschrieben.

Tabelle 30: Aminosäuresequenzen der gag p7/p1 und p1/p6 Proteaseschnittstellen**PI-resistenter HIV-1**

Wildtypsequenz	gag p7/p1	gag p1/p6
	E₁ R₂ Q₃ A₄ N₅ F₆ L₇ G₈ K₉ I₁₀	R₁ P₂ G₃ N₄ F₅ L₆ Q₇ S₈ R₉
Proben-Nr.		
99-1408	E ₁ R ₂ Q ₃ A ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ L ₆ Q ₇ S ₈ R ₉
99-1509	E ₁ R ₂ Q ₃ A ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ L ₆ Q ₇ S ₈ R ₉
00-0107	D ₁ R ₂ Q ₃ A ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ L ₆ Q ₇ S ₈ R ₉
00-0285	E ₁ R ₂ Q ₃ V ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ L ₆ Q ₇ S ₈ R ₉
01-0209	E ₁ R ₂ Q ₃ A ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ P ₆ Q ₇ S ₈ R ₉
01-0252	E ₁ R ₂ Q ₃ A ₄ N ₅ F ₆ L ₇ G ₈ K ₉ I ₁₀	R ₁ P ₂ G ₃ N ₄ F ₅ L ₆ Q ₇ S ₈ R ₉

4.6 Identifikation möglicher Infektketten und des Subtyps der Infektion**4.6.1 Überprüfung auf mögliche Infektketten und Kontamination**

Für die Bewertung der Übertragungshäufigkeit und ihrer möglichen Veränderung über die Zeit ist es wesentlich, zu wissen, ob die untersuchten HIV-Infektionen epidemiologisch in Beziehung stehen. Epidemiologische Verknüpfungen, sogenannte Infektketten, können anhand des Verwandtschaftsgrades von genomischen Sequenzen in Stammbaumanalysen festgestellt werden.

Die phylogenetischen Analysen auf der Basis von Sequenzalignments und Distanzmatrizen erlauben zugleich die Überprüfung auf Kontamination, die in der genotypischen Resistenzbestimmung durch die fortlaufende Amplifikation und Sequenzierung desselben *pol*-Segmentes verschiedener Virusisolate trotz räumlicher Trennung der Arbeitsschritte in Betracht zu ziehen ist. Zur Qualitätssicherung ist es erforderlich, Sequenzen, die aus derselben Experimentdurchführung stammen bzw. zeitnah zueinander untersucht wurden, in Stammbaumanalysen miteinander zu vergleichen. Sequenzen, die auf Kontamination beruhen, sind zu 100% identisch. Bei Kreuzkontamination von zwei stark viruslastigen Proben ist zu erwarten, dass die Direktsequenz nicht auswertbar ist (Überlagerung von Signalen).

Sequenzen, aus HIV-Infektketten, unterscheiden sich dagegen mehr oder weniger, je nachdem wie lange die Übertragung der Infektion zurückliegt. Je näher das Blutentnahmedatum beider Patienten am Übertragungszeitpunkt liegt, desto ähnlicher sind sich die Sequenzen, da sich die Viren nur eine kurze Zeit unabhängig voneinander entwickeln konnten. Da bei einer Infektion nicht alle Varianten einer Quasispezies übertragen werden und zudem Selektionsprozesse stattfinden, unterscheiden sich die Sequenzen aus Infektketten nah am Übertragungszeitpunkt mehr als es bei einer Kontamination der Fall ist. In Probenpaaren aus Infektketten, bei denen die Übertragung lange zurückliegt, wird der Rückschluss auf eine Infektkette unzuverlässiger, da die Sequenzunterschiede sich denen von unabhängigen Infektionen annähern, und die Beteiligung weiterer Bindeglieder nicht auszuschließen ist.

Zur Identifikation von Infektketten müssten alle Sequenzen aus dem Studienkollektiv in einer Stammbaumanalyse betrachtet werden. Da keine ausreichenden Rechnerkapazitäten zur Verfügung standen, wurden die Sequenzen in zwei Gruppen, nach der Reihenfolge der Untersuchung, analysiert (n=64, n=72).

Es wurde die Stammbaumanalyse der Consensus-DNA-Sequenzen des *Protease*-Gens mit dem Megalign Modul durchgeführt. Die prozentualen Divergenzwerte in diesem Softwaremodul werden in Bezug auf die rekonstruierte Phylogenie angegeben (Prozentsatz der Summe aller beobachteten Unterschiede der Sequenzen (siehe Kapitel 3.8).

In der Stammbaumanalyse fielen fünf Sequenzpaare auf, die jeweils eine signifikant abgetrennte monophyletische Gruppe bildeten (Daten nicht gezeigt) und im paarweisen Sequenzvergleich niedrigere Divergenzwerte aufwiesen, als unabhängig erworbene Infektionen (siehe Tabelle 31). Referenzviren des Subtyps B aus der HIV-Datenbank und andere unabhängige Isolate wiesen im *Protease*-Gen eine mittlere Divergenz von 4% auf, andere *Protease* Sequenzen aus dem Studienkollektiv variierten zwischen 2-6%. Bei vier der auffälligen Sequenzpaare lagen die Werte dagegen zwischen 0% und 1,1%; das fünfte Sequenzpaar wies eine Divergenz von 2,5% auf (siehe Tabelle 31). Die Proben stammten von verschiedenen Patienten (namenbasierter Code plus Geburtsjahr plus Postleitzahl Wohnort) und die Sequenzen wurden in unabhängigen Experimenten bestätigt.

Anhand der vorliegenden Daten der Patienten bzw. nach Auskunft der behandelnden Ärzte konnte eine Infektkette bestätigt werden (00-0271/00-0278). Zur Berechnung der Divergenzwerte von Infektketten wurden vier weitere Sequenzen verwendet, die aus zwei gesicherten Infektketten stammten, jedoch im untersuchten Patientenkollektiv nicht enthalten waren (keine Serokonverter). Bei den insgesamt drei dokumentierten Infektketten (nach Angaben der Patienten), die hier experimentell zur Verfügung standen, lagen die Divergenzwerte zwischen 0,3% und 1,7% (siehe Tabelle 31). In der Literatur ist beschrieben, dass die Diversität der Quasispezies eines infizierten, untherapierten Patienten im *pol*- bzw. *Protease*-

Gen zwischen 0,4% – 1% beträgt (Rouzine und Coffin 1999). In Infektketten, bei denen die Übertragung noch nicht zu lange zurück liegt, sind demnach ähnliche Werte zu erwarten.

Tabelle 31: Divergenzen und Identitäten epidemiologisch unverknüpfter und verknüpfter Nukleotidsequenzen des HIV-1 *Protease*-Gens

eng verwandte Sequenzpaare im Studienkollektiv	Divergenz % ± 1s	Identität % ± 1s
00-0271 und 00-0278	0,8	97,9
99-1407 und 00-0979	1,1	97,6
99-1004 und 97-3226	0,0	99,7
00-0134 und 00-0824	0,7	98,3
00-0990 und 00-1026	2,5	97,6
Sequenzpaare bekannter Verknüpfung		
gesichert unverknüpfte Infektionen Referenzviren Subtyp B (n=9)	4,0 ± 2,0	96,5 ± 1,7
gesicherte Infektketten (n=3)	1,1 ± 0,7	98,3 ± 0,7

Es werden daher mindestens drei weitere HIV-Infektketten angenommen, obwohl dazu anamnestisch keine Angaben vorliegen. Der fünfte Fall mit einer Divergenz von 2,5% zwischen den beiden *Protease*-Genen ist nicht eindeutig zu beurteilen.

Bemerkenswert ist die enge Sequenzverwandtschaft der Viren mit 0% Divergenz und 99,7% Sequenzidentität im *Protease*gen (00-0990/00-1026). Der Sequenzvergleich des gesamten sequenzierten *pol*-Segmentes zeigte, dass die 5'-aufwärtsliegende *gag/pol*-Schnittstelle und das 3'-folgende *RT*-Gen mehr Unterschiede aufwiesen als die *Protease*sequenz, so dass eine Kontamination auszuschließen ist. Nach der Analyse der *RT*-Sequenz und auch der *env*-Sequenz ist eine Infektkette anzunehmen (persönliche Mitteilung Dr. C. Kücherer). Eine Erklärung für diese überraschend stabile *Protease*struktur könnte sein, dass sich das Virus relativ wenig repliziert: die Infektion des Patienten erfolgte vermutlich Mitte 1997, und er hat seitdem eine relativ niedrige Viruslast von 10.000-20.000 geq/ml bei stabilem Immunstatus, die untersuchte Blutprobe stammte aus dem Jahr 1999. Der Partner in der Infektkette infizierte sich 1996 und die untersuchte Blutprobe wurde 1997 abgenommen.

In allen fünf epidemiologisch verknüpften Infektketten waren die Viren sensitiv gegenüber antiretroviralen Medikamenten.

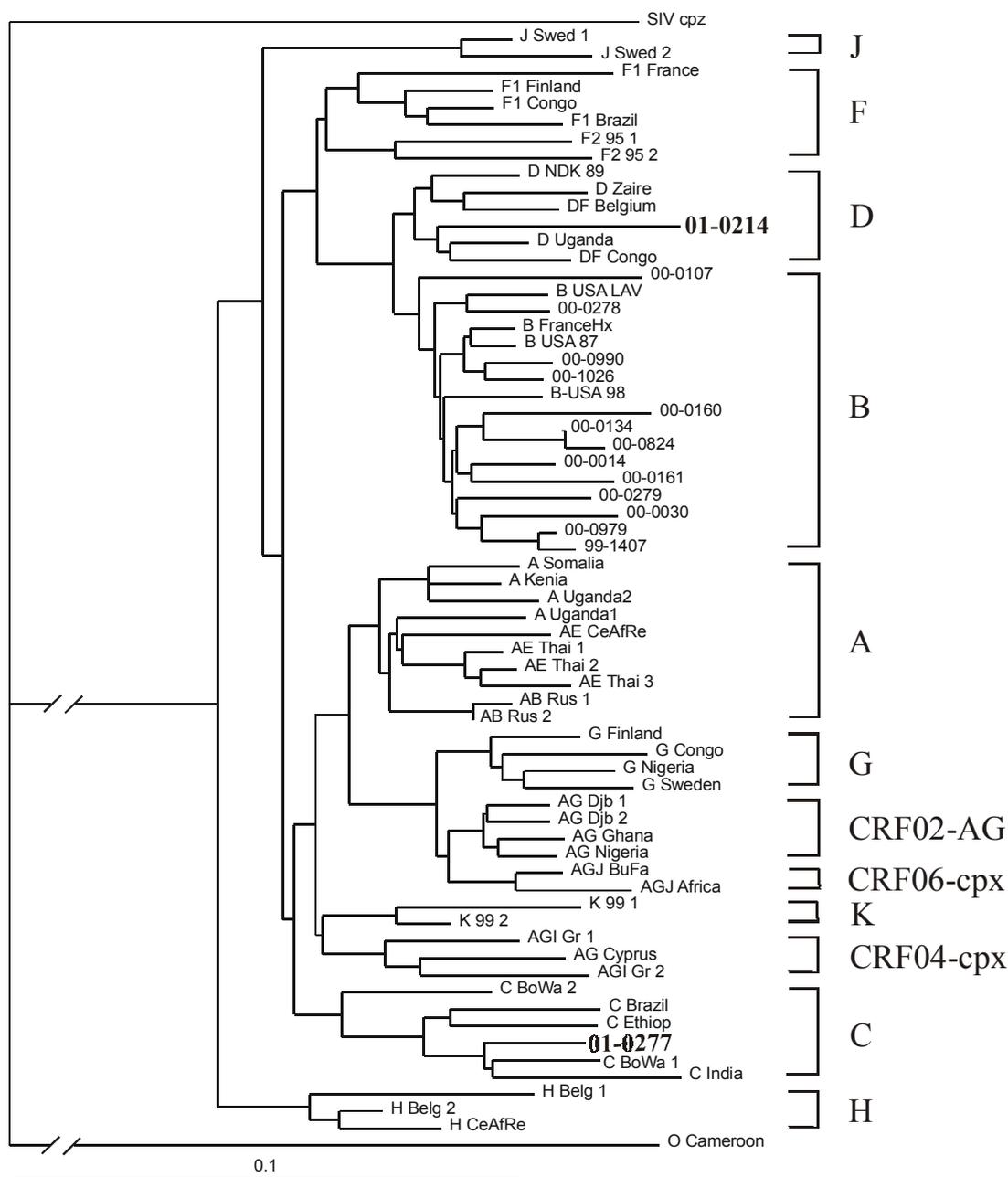
4.6.2 Identifikation des Subtyps der Infektion

Neben den in den Kapitel 1.6 beschriebenen resistenz-assoziierten primären und sekundären Mutationen, tragen auch die natürlichen Polymorphismen zur Entstehung antiretroviraler Resistenzen bei. Diese Polymorphismen sind subtypspezifisch und werden häufig bei Viren aus therapie-naiven PatientInnen beobachtet. Im Zusammenspiel mit anderen resistenz-assoziierten Mutationen können natürliche Polymorphismen bestehende Resistenzen verstärken oder fitness-mindernde Effekte primärer Mutationen ausgleichen (Martinez-Picado *et al.* 1999). Für Viren des HIV-1 Subtyps G und der Gruppe O sind natürliche Resistenzen gegen Proteaseinhibitoren bzw. NNRTI beschrieben (siehe Kapitel 1.6.3). Zur Untersuchung der Fragen, ob resistente Viren übertragen werden und ob diese eine verminderte Vermehrungsfähigkeit aufweisen, ist deshalb die Kenntnis der Subtypzugehörigkeit der untersuchten Viren notwendig.

Zur Subtypklassifizierung der 136 untersuchten Viren aus therapie-naiven Infizierten, wurden die *Protease*-Gensequenzen verwendet und mit den internationalen HIV-1-Referenzsequenzen aus der amerikanischen HIV-Datenbank (<http://www.hiv-web.lanl.gov>) in einer Stammbaumanalyse aus dem PHYLIP-Paket verglichen (DNAdist K2P, Neighbourjoining; siehe Kapitel 3.8). SIVcpz wurde als Außengruppe verwendet. In jeder Analyse wurden 15 zu typisierende Sequenzen untersucht. In Abbildung 7 ist exemplarisch ein Stammbaum zur Ermittlung der Subtypzugehörigkeit von HIV-Isolaten dargestellt.

Von den 136 untersuchten HIV-1 aus therapie-naiven PatientInnen, gehörten 134 zum HIV-1 Subtyp B. Ein Virus war dem HIV-1 Subtyp C zugehörig (01-0277). Die Index-Patientin hatte sich nach eigenen Angaben in Deutschland infiziert. In einem Fall wurde HIV-1 des Subtyps D durch heterosexuelle Kontakte mit einer Person aus einem Endemiegebiet in Deutschland übertragen (01-0214). Viren des HIV-1 Subtyps G und/oder Subtyps O, für die aufgrund der natürlichen Polymorphismen Resistenz gegen Protease- bzw. NNRT-Inhibitoren beschrieben sind, waren im hier untersuchten Patientenkollektiv nicht enthalten.

Abbildung 7: Phylogenetische Analyse von HIV-1 Isolat



Neighbourjoining Baum, 52 Referenzsequenzen

Die HIV-1 non-B-Isolate 01-0214 und 01-0277 sind fettgedruckt.

4.7 Resistenzen aufgrund natürlicher Polymorphismen (Subtypspezifische Resistenzen)

Wie in Kapitel 1.6.3 beschrieben, tragen subtypspezifische Aminosäuremuster in der Protease und der Reversen Transkriptase von Viren der HIV-1 non-B Subtypen zu natürlichen Resistenzen bei. Diese Polymorphismen, die in Viren des HIV-1 Subtyps B als resistenz-assoziierte Mutationen gelten, sind vor allem in Viren der Subtypen G und O natürlicher Weise vorhanden und nicht durch eine frühere Therapie selektioniert worden.

Durch eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Idoko (Dr. Moses Njoku, Abigail Edubio) der University of Jos, Nigeria konnten 14 nigerianische EDTA-Plasma-Proben von HIV-1 infizierten therapie-naiven PatientInnen erhalten und auf subtypspezifische Resistenzen in HIV der Subtypen G bzw. CRF02-AG (IBNG-like G) gegen antiretrovirale Medikamente untersucht werden. Die Subtypklassifizierung erfolgte durch phylogenetische Analysen der *gag*p17- und *env*C2V5-Region. Die CRF02-AG Rekombinante weist im *Protease*-Gen Sequenzen des Subtyps G, im *Reversen Transkriptase*- und im *env*-Gen Subtyp A Sequenzen auf (siehe Abbildung 8).

Von 14 dieser non-B HIV konnte die Protease und von 12 die Reverse Transkriptase genotypisiert werden (siehe Kapitel 3.17). Die phylogenetische Analyse der Protease stimmte überwiegend mit dem *gag*-Subtyp überein. Demnach lagen 9/14 Proben mit Subtyp G, 4/14 mit Subtyp CRF02-AG und in einem Fall die Rekombinante CRF06-cpx (A/G/J/K) vor.

Die Analyse der resistenz-assoziierten Mutationen der Protease der neun als HIV Subtyp G klassifizierten Isolate (Subtyp B NL4.3 als Referenz) bestätigte die in der Literatur beschriebenen Mutationen an den Positionen 20, 36, 67, 82 (Descamps *et al.* 1998).

Die HIV-Isolate mit CRF02-Genomstruktur enthielten Mutationen an den Aminosäurepositionen 20 und 36 der Protease. Zwei dieser Isolate enthielten zusätzlich Mutationen in Codon 82 (Protease). Die in der Literatur beschriebene und in den Subtyp G Isolaten vorhandene Mutation an Position 67 wurde in den CRF02-AG Rekombinanten nicht nachgewiesen.

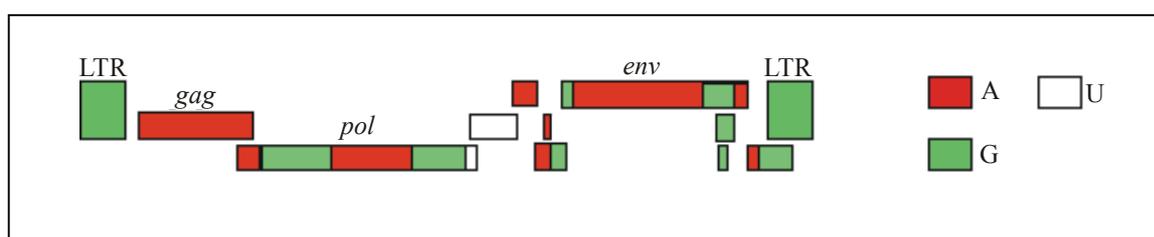
Bei den nigerianischen HIV mit Subtyp G wurde aufgrund der genotypischen Analyse und der Beschreibungen in der Literatur eine Resistenz gegen die Proteaseinhibitoren SQV und RTV erwartet. Interessanterweise deuteten die Untersuchungen der Subtyp CRF02-AG Varianten nur auf eine natürliche Resistenz gegen SQV hin. Der Unterschied zu den reinen Subtyp G Viren könnte durch die rekombinante Genomstruktur der *pol*-Region bedingt sein (siehe Abbildung 8).

Die genotypische Analyse der Reversen Transkriptase der 12 nigerianischen HIV Varianten vom Subtyp G oder CRF02-AG zeigte nur an den Positionen 211 und 214 resistenz-assoziierten Mutationen. Aminosäureaustausche an diesen Positionen sind auch von HIV mit Subtyp B als natürliche Polymorphismen bekannt und führen in Abwesenheit anderer resistenz-assoziiierter Mutationen nicht zu einer *in vitro* Resistenz. Eine natürliche Resistenz der Reversen Transkriptase gegen antiretrovirale Medikamente war weder bei den Subtyp G noch bei den rekombinanten CRF02-AG HIV zu erwarten.

Sowohl in der Protease als auch in der Reversen Transkriptase der nigerianischen HIV wurden neben den beschriebenen Mutationen weitere detektiert, die nicht als resistenz-assoziiert beschrieben sind.

Von jeweils zwei Proben der HIV Subtypen CRF02-AG und G wurde wie in Kapitel 3.18 beschrieben eine phänotypische Resistenzanalyse der Protease durchgeführt. Wider Erwarten waren alle untersuchten *pol*-Fragmente sensitiv gegen die getesteten Proteaseinhibitoren (RTV, APV, SQV, NFV, IDV). Offensichtlich tragen nicht nur die beschriebenen Mutationen in der Protease zur antiretroviralen Resistenz bei, sondern auch Mutationen in anderen viralen Genen. Zur Untersuchung der subtypspezifischen antiretroviralen Resistenz sollte deshalb das gesamte Virus betrachtet werden und nicht nur das für die therapeutischen Zielenzyme codierende *pol*-Fragment.

Abbildung 8: Genomstruktur von HIV-1 des Subtyps CRF02-AG (IBNG-like)



4.8 Untersuchung der viralen Fitness antiretroviral resistenter HIV-1

Resistenz-assoziierte Mutationen in der Protease und der Reversen Transkriptase können zu einer verminderten Bindungsfähigkeit Enzyme an ihr natürliches Substrat führen. Da die Enzyme eine Schlüsselrolle der viralen Replikation einnehmen, besteht deshalb die Möglichkeit, dass antiretroviral-resistente HIV-1 durch die mutierten Enzyme zwar gegen Inhibitoren resistent sind, aber in Abwesenheit des antiretroviralen Wirkstoffs eine im Vergleich zu sensitiven Wildtypviren verminderte Vermehrungsfähigkeit zeigen. Sollten diese Viren jedoch aufgrund von kompensatorischen Mutationen an anderen Positionen der therapeutischen Zielenzyme oder auch in anderen viralen Genen genauso schnell replizieren wie der Wildtyp, würden sich Infektionen mit bereits resistenten Viren rasch ausbreiten und in absehbarer Zeit wäre eine erfolgreiche Therapie von HIV Infektionen nicht mehr durchführbar. Deshalb ist die epidemiologische Bedeutung resistenter HIV nicht nur von ihrer Übertragungshäufigkeit, sondern auch von ihrer Replikationskompetenz abhängig, so dass die Kenntnis der viralen Fitness zur Einschätzung des weiteren Verlaufs der HIV-Epidemie notwendig ist.

Auswahl der HIV-1 Isolate zur Untersuchung der viralen Fitness

Zur Untersuchung der viralen Fitness resistenter HIV-1, sind klonale Isolate bekannter Sequenz erforderlich. Dazu wurden die *pol*-Fragmente (siehe Kapitel 3.3) zunächst in den pBSSK⁺-Vektor kloniert (siehe Kapitel 3.9) und sequenziert (siehe Kapitel 3.7). Es wurden Klone ausgewählt, die der ermittelten Consensus-Sequenz entsprachen oder partielle Resistenzmuster aufwiesen. Zur Quantifizierung der Replikationseffizienz in Abwesenheit von Medikamenten im *in vitro* Phänotypassay (siehe Kapitel 3.18), wurden die *pol*-Fragmente aus den pBSSK⁺-*pol* Klonen in den PR-RT-Deletionsvektor (pHΔ5PRT) ligiert (siehe Kapitel 3.9) und durch Transfektion von 293T-Zellen rekombinante infektiöse Viren hergestellt (siehe Kapitel 3.13).

Die *pol*-Fragmente, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, stammten aus Viren von zwei Patienten, die sich mit bereits resistenten HIV-1 infiziert hatten und wurden aufgrund der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalyse ausgewählt.

Im ersten Fall (Nr.: 99-1408). handelte es sich um ein multiresistentes Virus mit zahlreichen primären und sekundären resistenz-assoziierten Mutationen sowohl in der Protease als auch der Reversen Transkriptase. In der Sequenzanalyse von acht Klonen dieser Probe wurde überraschenderweise nur ein Klon, der mit der ermittelten Consensus-Sequenz identisch war identifiziert (Klon 05), das heißt, die zur *in vitro* Resistenz führende Variante lag als mino-

ritäre Variante vor. Bei Klon 02 lagen an den Position 1-20 der Protease untypische Aminosäuren vor, gefolgt von einem Stopcodon. Diese für retrovirale Proteasen untypische Sequenz führte zu einem Leserahmenwechsel in der Reversen Transkriptase.

Bei Klon 09 handelte es sich um eine Deletionsmutante, bei der in der Protease die Aminosäure 53 und in der Reversen Transkriptase die AS 5-10 fehlten. Beide Klone sind nicht in der Lage funktionsfähige Enzyme zu exprimieren. Die Anwesenheit von ca. 25% Defektmutanten in der Quasispezies deutet auf eine geringere Replikationsfähigkeit der übertragenen Viruspopulation hin. In zwei weiteren Klonen (Klon 01 und Klon 03) fehlte der mit starker 3TC-Resistenz assoziierte Austausch von Methionin durch Valin an Position 184 der RT (M184V).

Im zweiten ausgewählten Fall (97-4527) lagen mit AZT-Resistenz assoziierte Mutationen im Genotyp und *in vitro* zusätzlich zur AZT-Resistenz eine sechsfache phänotypisch bestimmte Resistenz gegen Delavirdin vor, die anhand der Consensus-Sequenz nicht zu erwarten war. Die Untersuchung von zehn Klonen zeigte das Vorhandensein der NNRTI-assoziierten Mutation K101R in ca. 30% der Isolate (siehe Kapitel 4.3). Dieser Befund deutet darauf hin, dass Viren, die diese Mutation tragen, bei fehlendem Selektionsdruck durch die Therapie schnell vom Wildtyp überwachsen werden.

Für die Untersuchung der viralen Fitness wurden die Klone 99-1408-K03, 99-1408-K04, 99-1408-K05 und 97-4527-K12 ausgewählt, die genotypischen Resistenzmuster dieser Proben sind in Tabelle 32 dargestellt. Die erwartete phänotypische Resistenz der ausgewählten klonalen Isolate ist in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 32: Virale Fitness: genotypische Resistenzmuster der ausgewählten klonalen Isolate

Klon-Nummer	resistenz-assoziierte Mutationen	
	Protease	Reverse Transkriptase
99-1408-K03	L10I, K20R, M36I, M46L, I54V, D60E , L63P, A71V, I84V, L90M I93L	D67N, T69N , K70R, R211K, L214F, K219Q
99-1408-K04	L10I, K20R, M36I, M46L, I54V, Q58E , L63P, A71V, I84V, L90M I93L	D67N, K70R, M184V , R211K, L214F, K219Q
99-1408-K05	L10I, K20R, M36I, M46L, I54V, D60E , L63P, A71V, I84V, L90M I93L	D67N, T69N, K70R, M184V , R211K, L214F, K219Q
97-4527-K12	L63P	M41L, S68G, K101R , R211K, L214F, T215D

Die Aminosäuresubstitutionen, in denen sich Klone eines Isolats untereinander bzw. von der Consensus-Sequenz der Quasispezies unterscheiden, sind fett gedruckt.

Tabelle 33: Virale Fitness: anhand des Genotyps vorhergesagte phänotypische Resistenzprofile der ausgewählten klonalen Isolate

Klon-Nummer	<i>in vitro</i> Resistenz gegen	
	Proteaseinhibitoren	Reverse Transkriptase Inhibitoren
99-1408-K03	alle PI (APV, IDV, NFV, RTV, SQV)	AZT, ddC, d4T
99-1408-K04	alle PI	AZT, ddC, d4T, 3TC
99-1408-K05	alle PI	AZT, ddC, d4T, 3TC
97-4527-K12	sensitiv	AZT, DLV

Herstellung rekombinanter infektiöser HIV-1 (Virusstocks)

Für die Untersuchungen zur viralen Fitness wurde wie bereits in der phänotypischen Resistenzbestimmung der Vektor pH Δ 5PRT verwendet (Walter *et al.* 1999; NRZ Retroviren, Universität Erlangen-Nürnberg). Der HIV-Vektor auf pNL4.3 Basis ist so modifiziert, dass das *pol*-Fragment (*gag/pol* Schnittstelle, virale Protease und die ersten 300 AS der Reversen Transkriptase) einkloniert und rekombinante infektiöse Viren erzeugt werden können. Dadurch ist gewährleistet, dass die eventuellen Unterschiede in der Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Viren durch das *pol*-Insert bedingt werden und nicht in anderen Regionen des Virus codiert sind. Es wurden durch Ligation der *pol*-Fragmente aus den ausgewählten HIV-pBSSK⁺-Klonen in den Deletionsvektor Plasmide hergestellt und in einer Restriktionsanalyse überprüft (siehe Kapitel 3.12).

Die Herstellung rekombinanter infektiöser Viren erfolgte durch Transfektion von 293T-Zellen mit den pH5 Δ PRT-*pol*-Plasmiden (siehe Kapitel 3.13). Die HIV-Titer der Zellkulturüberstände wurden in 8fach Bestimmung beginnend mit einer 1:1000 Verdünnung (siehe Kapitel 3.14.3) und einer unteren Nachweisgrenze der TCID₅₀ von 3x10³/ml ermittelt. Die Ergebnisse der Bestimmung der HIV-Titer sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Titerbestimmung der HIV-293T-Virusstocks in zwei unabhängigen Versuchsansätzen

Klon	TCID ₅₀ /ml	TCID ₅₀ /ml
NL4.3-1	1,77x10 ⁵	0,89x10 ⁵
NL4.3-2	2,68x10 ⁵	3,08x10 ⁵
99-1408-K03	1,54x10 ⁵	1,35x10 ⁵
99-1408-K04	1,02x10 ⁵	1,17x10 ⁵
99-1408-K05	2,68x10 ⁵	1,78x10 ⁵
97-4527-K12	2,03x10 ⁵	1,78x10 ⁵

Bei den Klonen NL4.3-1 und NL4.3-2 handelt es sich um rekombinante HIV-1 NL4.3 Wildtypviren, die in zwei unabhängigen Transfektionsansätzen hergestellt wurden, um die Reproduzierbarkeit der Transfektionseffizienz und die Herstellung infektiöser, rekombinanter Viren zu überprüfen. Die Wiederholung der Titerbestimmung ergab reproduzierbare Ergebnisse. Der Unterschied in den ermittelten Titern von ca. 1/3 log-Stufe zwischen zwei unabhängigen Versuchsansätzen ist gering und liegt in der statistisch zu erwartenden Fehlergrenze.

Zur Überprüfung, ob sich die Aminosäuremuster der Protease und Reversen Transkriptase durch die Expression der Viren in 293T-Zellen verändert haben, wurde aus den infektiösen Zellkulturüberständen (Virusstocks) die virale RNA extrahiert und die Sequenz des *pol*-Fragmentes erneut untersucht. Die Aminosäuresequenzen der HIV-1 Klone wichen in keinem Fall von der Ausgangssequenz ab; die rekombinant hergestellten HIV wiesen die erwarteten Resistenzeigenschaften auf.

Infektion von CEMx174-SEAP Zellen mit rekombinanten, antiretroviral resistenten und sensitiven HIV-1

Es wurden zunächst mit den rekombinanten HIV aus 293T-Zellen die Reporterzellen CEMx174-SEAP mit verschiedenen Virusdosen infiziert (m.o.i. 0,1 und 0,01). Eine m.o.i. von 0,1 entspricht einer infektiösen Einheit pro zehn Zellen, eine m.o.i. von 0,01 entsprechend 1/100 Zellen. Zwei Stunden nach Infektion wurden die Zellen gewaschen, in RPMI1640-Medium eingestellt und in ca. zwölfstündigen Abständen Proben des Zellkulturüberstandes abgenommen (siehe Kapitel 3.19).

Aus diesen HIV-CEMx174-SEAP Zellkulturüberständen wurde aus den Abnahmen 69 Stunden p.i. die virale Sequenz erneut überprüft (siehe Kapitel 3.17). Bezogen auf die resistenz-assoziierten Mutationen wurde keine Abweichung von den ermittelten Ausgangssequenzen beobachtet. Dadurch wurde sichergestellt, dass auch während des Infektionsexperimentes zur Messung der Replikationseffizienz keine unerwünschten Mutationen aufgetreten sind. Im folgenden wurden vier verschiedene Verfahren zur Quantifizierung der produzierten Viren im Kulturüberstand der CEMx174-SEAP Zellen eingesetzt.

4.8.1 Etablierung und Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der viralen Fitness von HIV-1 Isolaten

Zunächst wurde die Quantifizierung der Virusreplikation durch Messung der sezernierten Alkalischen Phosphatase (siehe Kapitel 3.14.1) etabliert, indem in Vorversuchen nach Infektion der CEMx174-SEAP Zellen mit NL4.3-Wildtypvirus der Zellkulturüberstand abgenommen, die luminometrische Messung der sezernierten Alkalischen Phosphatase optimiert und die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft wurde (Daten nicht gezeigt).

Alle miteinander verglichenen Zellkulturüberstände wurden prinzipiell im gleichen Assay in Dreifachbestimmung gemessen. Es zeigte sich, dass die zur Lumineszenz führende Enzymreaktion sehr stabil und gleichmäßig war, so dass Mehrfachmessungen desselben Ansatzes möglich waren, ohne dass es durch die längere Inkubation mit Substrat zu einer nennenswerten Veränderung der Messdaten kam. Die Varianz der gemessenen RLU (relative Licht Einheiten) betrug 5% innerhalb von 14 h, so dass es nicht notwendig war, die zu vergleichenden Kulturüberstände zeitgleich zu messen. Im verwendeten TECAN Fluorometer betrug die Messzeit für eine Mikrotiterplatte (96-well) zwei Minuten, wodurch große Ansätze ohne Verluste in der Messgenauigkeit durchgeführt werden konnten.

Nach der Etablierung der SEAP-Messung, die auch zur phänotypischen Resistenzbestimmung von HIV-1 verwendet werden kann, wurde anhand der Wachstumskinetik des HIV-NL4.3-Wildtypvirus die Vergleichbarkeit der Methoden zur Detektion der Virusvermehrung *in vitro* untersucht. Dazu wurde von jedem CEM-HIV-NL4.3-SEAP Zellkulturüberstand die p24-Antigen Konzentration (siehe Kapitel 3.14.2), die von den Zellen in den Kulturüberstand sezernierte Alkalische Phosphatase (SEAP; siehe Kapitel 3.14.1) und der infektiöse Titer (siehe Kapitel 3.14.3) bestimmt.

Es wurde 36 Stunden nach Infektion der Zellen mit einer m.o.i. von 0,1 ein Anstieg der Virusreplikation (SEAP) und Virusproduktion (p24-Antigen, infektiöser Titer) beobachtet (siehe Abbildungen 9 und 10). Wurde mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert, konnte erst 12 Stunden später, das heißt 48 Stunden nach Infektion Virusvermehrung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, dass eine Änderung der infektiösen Dosis um den Faktor 10 die Viruskinetik um ca. 12 Stunden verschiebt.

Die Untersuchungen ergaben eine gute Korrelation der SEAP-Werte mit den p24-Antigenkonzentrationen (siehe Abbildung 9) und den infektiösen Titern der Zellkulturüberstände (siehe Abbildung 10), so dass jeder der drei Parameter p24-Antigenkonzentration, SEAP-Aktivität und infektiöser Titer geeignet ist, Virusvermehrung *in vitro* zu quantifizieren und zu vergleichen.

Abbildung 9: Wachstumskinetik von HIV-1 NL4.3-Wildtypvirus nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1):

p24-Ag-Konzentration und SEAP-Aktivität

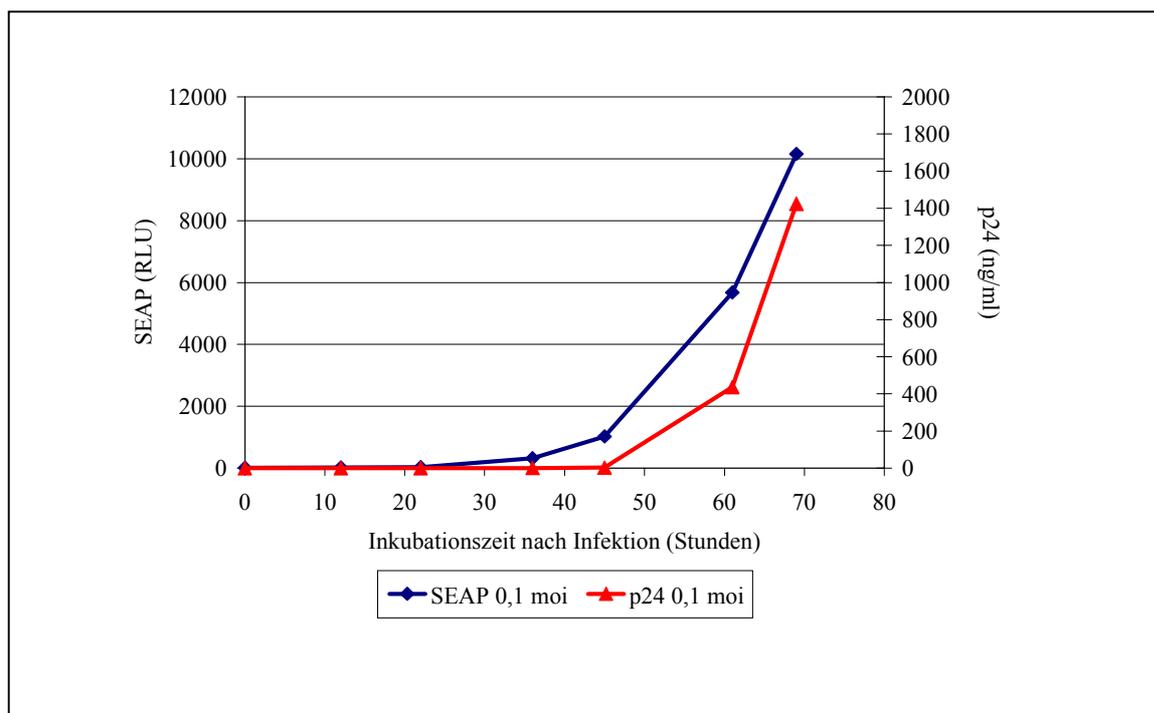
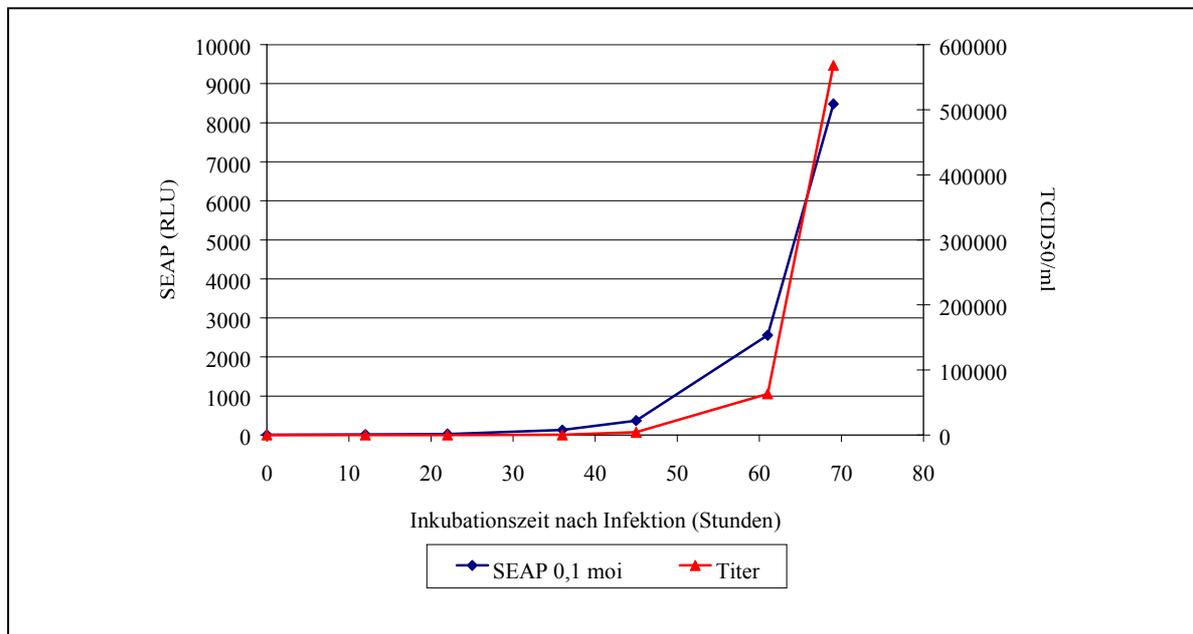


Abbildung 10: Wachstumskinetik von HIV-1 NL4.3-Wildtypvirus nach Infektion von CEM-174xSEAP-Zellen (m.o.i. 0,1):

infektiöser Titer und SEAP-Aktivität



4.8.2 Vergleich der Vermehrungsfähigkeit (virale Fitness) rekombinanter antiretroviral resistenter und sensibler HIV-1

Die Wachstumskinetik aller ausgewählten rekombinanten infektiösen HIV-1 Klone wurde zunächst durch Messung der von den Zellen sezernierten Alkalischen Phosphatase (SEAP) (siehe Kapitel 3.14.1) und durch Quantifizierung der p24-Antigen-Konzentration (siehe Kapitel 3.14.2) untersucht.

Dabei zeigten die resistenten HIV-Klone 99-1408-K03 (Resistenz gegen die Proteaseinhibitoren IDV, SQV, NFV, APV, RTV und nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren AZT, ddC und d4T), 99-1408-K04, 99-1408-K05 (Resistenz wie 99-1408-K03 zusätzlich 3TC) und 97-4527-K12 (Resistenz gegen AZT, DLV) eine deutlich geringere Vermehrungseffizienz (virale Fitness) als die sensiblen Wildtypklone pNL4.3-1 und pNL4.3-2 (siehe Abbildungen 11 und 12).

Abbildung 11: Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1):

SEAP-Aktivität

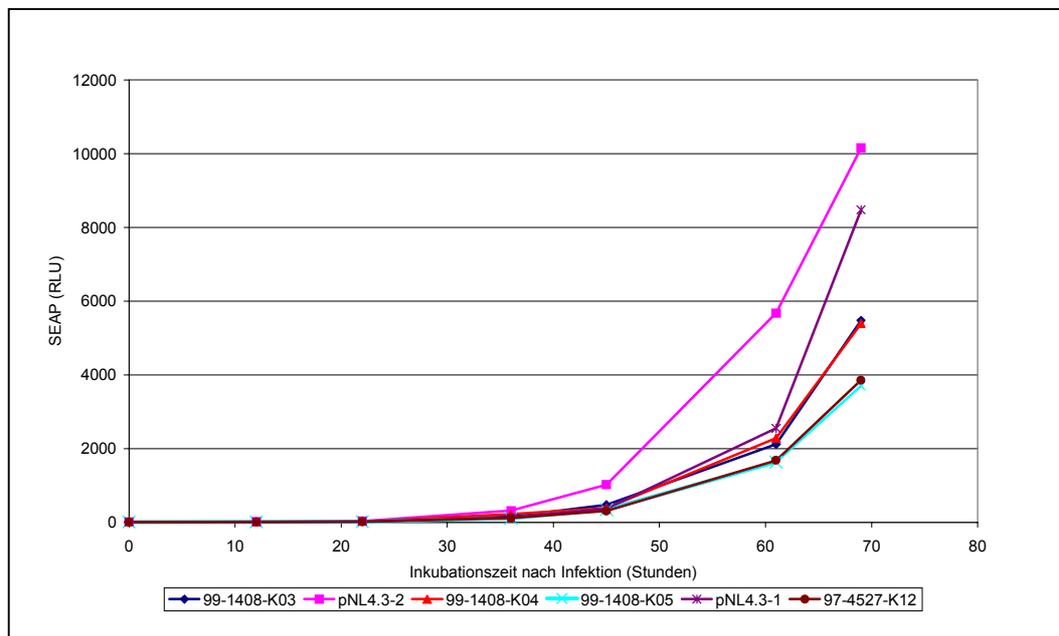
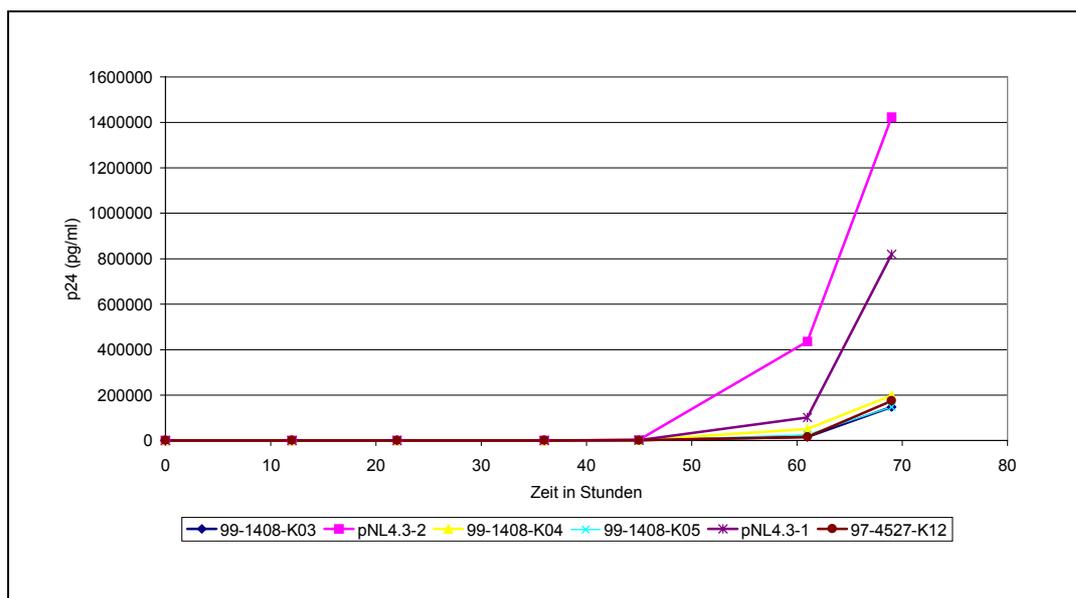


Abbildung 12: Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1):

p24-Antigen-Konzentration

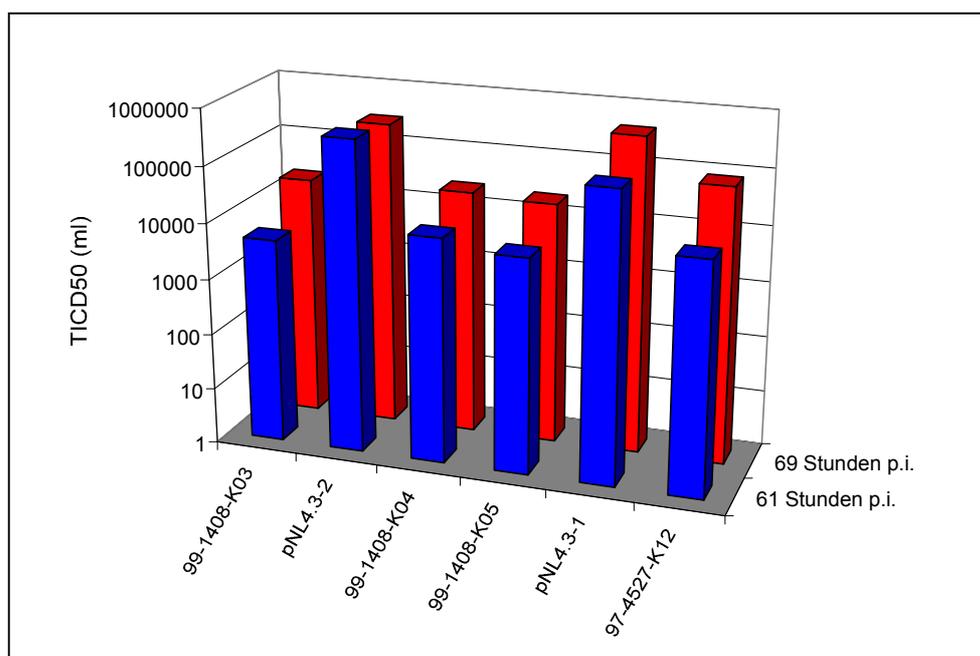


Anschließend wurde der zellfreie virushaltige Zellkulturüberstand aus den Abnahmen 61 Stunden und 69 Stunden p.i. der Wachstumskinetik auf CEMx174-SEAP Zellen titriert. Wie erwartet war die Infektiosität der Zellkulturüberstände nach 69 Stunden höher, als nach 61 Stunden Inkubationszeit. Die einzige Ausnahme lag bei Probe pNL4.3-2 vor. Hier war der infektiöse Titer nach 69 Stunden aufgrund des Absterbens der Zellen ca. 0,5 log-Stufen niedriger als nach 61 Stunden p.i.

Die Infektion mit den drei multiresistenten Klonen der Probe 99-1408 führte zu einem etwas niedrigeren Titer, als die Infektion mit dem AZT-resistenten Klon 97-4527-K012. Dabei zeigte jedoch die Anwesenheit der resistenz-assoziierten Mutation an Position 184 der Reversen Transkriptase (M184V) in den HIV-1 Klonen 99-1408-K04 und 99-1408-K05 keinen fitnessmindernden Einfluss, so dass der Titer dieser Proben mit dem des Klons 99-1408-K03, in dem die genannte Mutation fehlt, vergleichbar war. Im Vergleich zu den sensitiven Wildtyp Klonen, zeigten jedoch alle vier getesteten resistenten Klone einen deutlich geringeren Titer bzw. Replikationskapazität (siehe Abbildung 13).

Abbildung 13: Vergleich der Replikationseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen (m.o.i. 0,1)

Infektiöser Titer (TCID₅₀)



blau = 61 Stunden p.i. , rot = 69 Stunden p.i. (log-Skalierung)

Eine weitere Möglichkeit Virusproduktion zu messen, ist die Quantifizierung der viralen RNA mit *real time* PCR (TaqMan-Methode, siehe Kapitel 3.14.4). Dazu wurde die virale RNA aus den Zellkulturüberständen der Wachstumskinetik 69 h p.i. extrahiert und in Dreifachbestimmung mit Hilfe von Oligo dT-Primern und kommerziell erhältlicher Reverser Transkriptase (RT, Superscript[®]) in cDNA transkribiert (siehe Kapitel 3.2). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle die cDNA-Synthese in Abwesenheit der RT durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde im Anschluss in einer *env*TaqMan-PCR (siehe Kapitel 3.14.4) durch den Vergleich mit einem externen Standard bekannter Konzentration (pBT1) quantifiziert. Die gemessenen cDNA-Konzentrationen gelten unter der Annahme gleichbleibender Effizienz der RT-Reaktion als Maß für zugrunde liegende virale RNA-Konzentrationen.

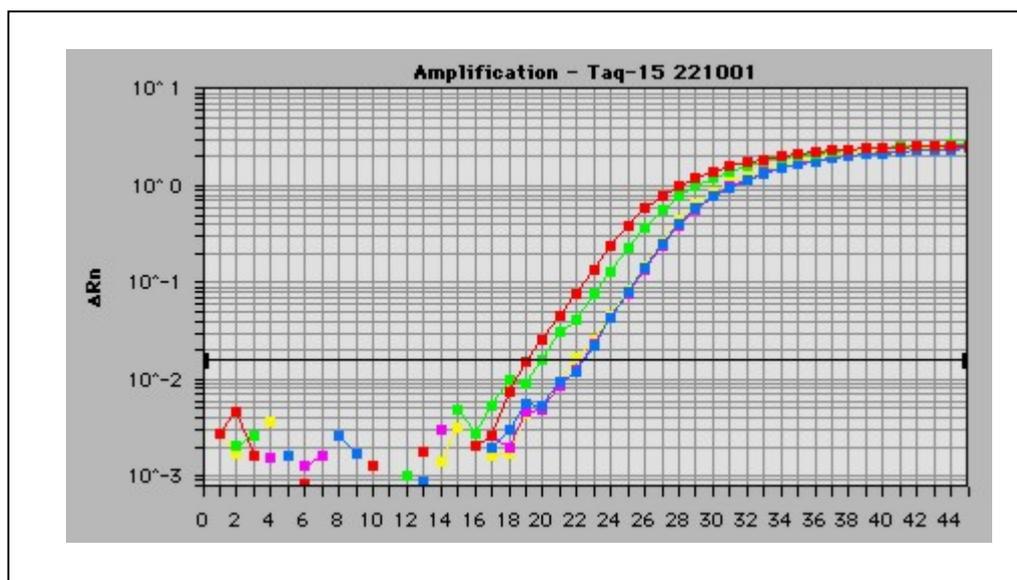
Auch in der Negativkontrolle jeder Probe wurden positive Ergebnisse erhalten, die nach externem Standard ca. 10^4 geq/ml enthielten (Mittelwert $ct = \text{PCR-Zyklen } 28,90 \pm 2,64$). Nach Lugert *et al.* (1996) enthalten die Taq-Polymerase und das dem PCR-Ansatz zugesetzte RNAsin unterhalb von 72°C eine Reverse Transkriptase Aktivität, wodurch sich die gemessenen Signale in den Negativkontrollen erklären.

Die Virusproduktion gemessen als cDNA-Konzentration war bei den Wildtypviren mit $7\text{-}8 \times 10^7$ geq/ml am höchsten (siehe Abbildung 14). Die rekombinanten Viren mit den multi-resistenten Enzymen Protease und Reverse Transkriptase replizierten am schlechtesten: es wurden cDNA-Konzentrationen von durchschnittlich 1×10^7 geq/ml gemessen. Die Infektion mit AZT und DLV resistenten Viren (Probe 97-4527-K12) führte im Vergleich zur Infektion mit den multiresistenten Viren (99-1408-K03 bis K05) zu ähnlichen Konzentrationen viraler RNA, wobei jedoch die RNA-Menge in den Überständen der 3TC-resistenten Klone (M184V) der multiresistenten Probe geringfügig niedriger war als in den Überständen der 3TC-sensitiven Klone 99-1408-K03 und 97-4527-K12 (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Untersuchung der viralen Fitness rekombinanter antiretroviral resistenter Viren durch Quantifizierung der viralen RNA mit *real time env*-PCR

Klon Nr.	phänotypische Resistenz	ct-Wert	Anzahl RNA-Moleküle/ml
pNL4.3-1	sensitiv Wildtyp	19,36	$8,0 \times 10^7$
pNL4.3-2	sensitiv Wildtyp	19,16	$7,2 \times 10^7$
99-1408-K03	alle PI, AZT, ddC, d4T	21,97	$1,2 \times 10^7$
99-1408-K04	alle PI, AZT, ddC, d4T, 3TC	22,54	$0,8 \times 10^7$
99-1408-K05	alle PI, AZT, ddC, d4T, 3TC	22,37	$0,9 \times 10^7$
97-4527-K12	AZT	19,96	$1,3 \times 10^7$

Abbildung 14: TaqMan *env*-PCR zur Quantifizierung von HIV-1 RNA nach Infektion von CEMx174-SEAP Zellen mit rekombinanten HIV-1



rot = Wildtyp, grün = 97-4527, rot = 99-108-K03, blau = 99-1408-K04, violett = 99-1408-K05

Der Vergleich der Vermehrungseffizienz resistenter HIV-1 Klone zu sensitivem Wildtyp 69 Stunden nach Infektion der Zellen zeigte, dass mit allen hier verwendeten Methoden (Messung der SEAP Aktivität, p24-Antigen Assay, Bestimmung des infektiösen Titers und Quantifizierung der viralen RNA) Virusvermehrung quantifiziert werden kann.

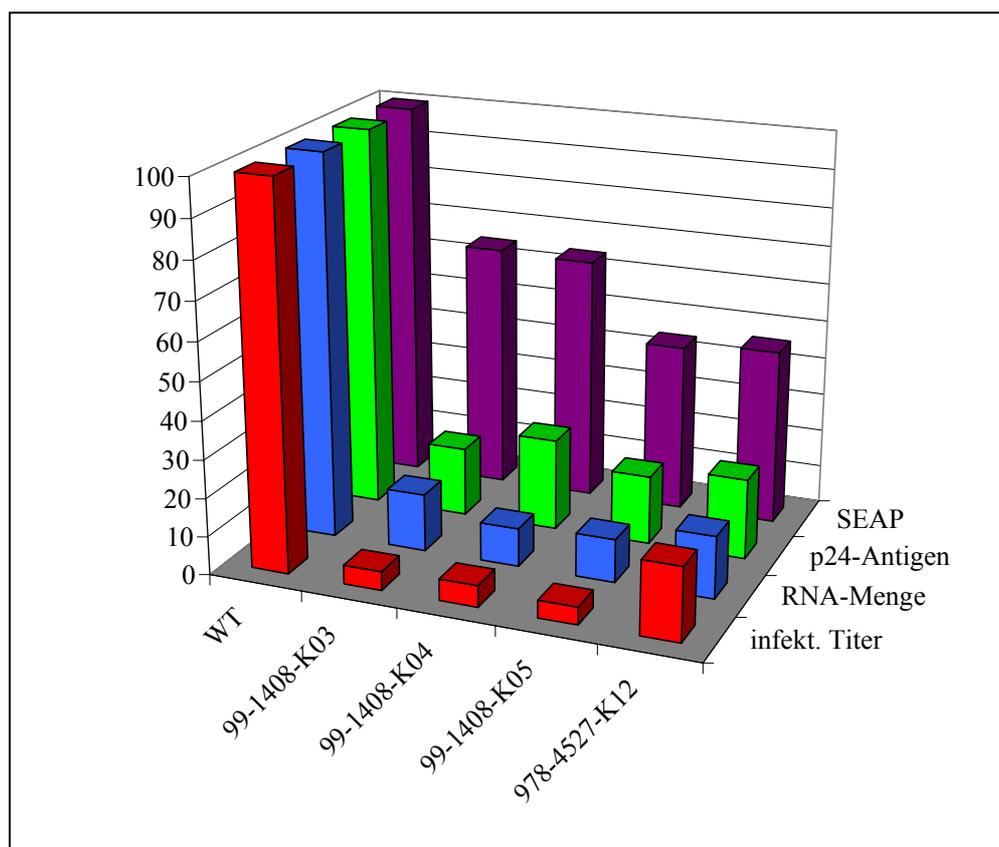
In allen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die resistenten HIV Klone langsamer replizieren, als die Wildtypklone und somit die resistenz-assoziierten Mutationen zu einer niedrigeren Vermehrungsrate der entsprechenden Viren führen (siehe Abbildung 15). Bei gleicher viraler Fitness der resistenten und der sensitiven HIV Klone hätte nach Infektion mit identischer infektiöser Dosis nach einer bestimmten Inkubationszeit in den Zellkulturüberständen eine vergleichbare Virusmenge vorliegen müssen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Hypothese der verminderten viralen Fitness antiretroviral resistenter Klone im Vergleich zum sensitiven Wildtyp HIV-1.

Dabei zeigte jedoch die Anwesenheit der resistenz-assoziierten Mutation an Position 184 der Reversen Transkriptase (M184V) in den HIV-1 Klonen 99-1408-K04 und 99-1408-K05 wider Erwarten keinen zusätzlichen fitness-mindernden Einfluss, so dass die Vermehrungsfähigkeit dieser Klone mit der des Klons 99-1408-K03, in dem die genannte Mutation fehlt, vergleichbar war. Nur in der RNA-Quantifizierung konnte eine geringfügige Reduktion beobachtet werden.

Die Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass offensichtlich sowohl die PI-Resistenz assoziierten Mutationen, die in den drei Klonen der Probe 99-1408 enthalten waren, als auch die mit AZT- und DLV-Resistenz assoziierten Mutationen des Klons 97-4527-K12 fitnessvermindernde Eigenschaften aufweisen. Möglicherweise werden diese im natürlich vorkommenden Virusisolat durch Mutationen an anderen Positionen des viralen Genoms kompensiert, da sie noch 13 Monate (97-4527) bzw. 17 Monate (99-1408) nach Serokonversion nachweisbar waren.

Für zukünftige Untersuchungen der viralen Fitness ist es ausreichend die Replikationseffizienz der Viren mit nur einer der hier verwendeten Methoden 60 bis 70 Stunden nach Infektion der Zellen zu quantifizieren.

Abbildung 15: Replikationseffizienz resistenter HIV Klone im Vergleich zu sensitivem Wildtyp (69h p.i. CEMx174-SEAP-Zellen)



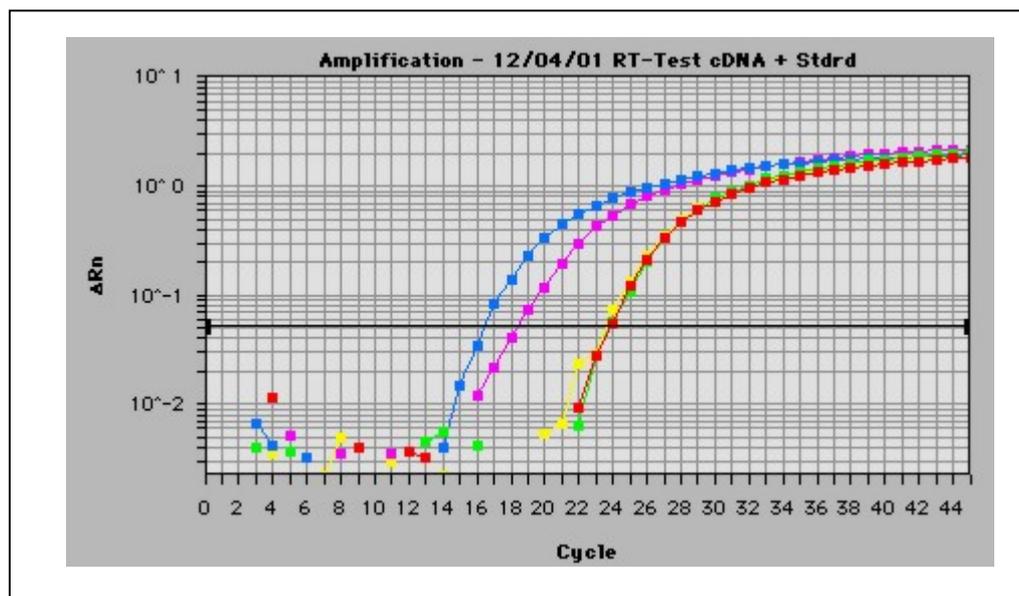
4.9 RT-Aktivität rekombinanter resistenter HIV-1

Zur Untersuchung, ob resistenz-assoziierte Mutationen der Reversen Transkriptase einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben, wurden die Aktivitäten antiretroviral resistenter und sensitiver klonaler Reverser Transkriptasen in einem enzymatischen Assay bestimmt. Dazu wurde die Enzymaktivität der viralen Reversen Transkriptase in einer cDNA-Synthese gemessen, in der als einzelsträngige Matrize MS2-Phagen RNA eingesetzt wurde. Die Quantifizierung der cDNA und somit der Enzymaktivität erfolgte anschließend in einer MS2-spezifischen TaqMan PCR (siehe Kapitel 3.15). Im Falle eines fitnessmindernden Einflusses der resistenz-assoziierten Mutationen in der RT, wurde eine geringere Aktivität der resistenten Enzyme erwartet. In diesem Fall sollte im Vergleich zur sensitiven Wildtyp-RT weniger Matrize (Phagen RNA) umgeschrieben werden.

Die zellfreien Kulturüberstände der resistenten HIV-1 Klone (99-1408-K03, 99-1408-K04, 99-1408-K05, 97-4727-K12) und der sensitiven Wildtyp-Klone (pNL4.3-1, pNL4.3-2) aus der Wachstumskinetik 69 Stunden p.i. (siehe Kapitel 4.8) wurden wie in Kapitel 3.15.1 beschrieben, aufgearbeitet und die RT-Aktivität in der RT-TaqMan-PCR quantifiziert (siehe Kapitel 3.15.3 und Abbildung 16).

Als Standard wurde kommerziell erhältliche Reverse Transkriptase Superscript (Gibco BRL) in den Konzentrationen 0,2 / 2 / 20 / 200 U/ml eingesetzt. Die gemessenen ct-Werte des Standards wurden in Abhängigkeit der RT-Aktivitäten zur Erstellung einer Standardkurve auf halblogarithmisches Millimeterpapier aufgetragen und daran die RT-Aktivität der Virus-suspensionen in U/ml abgelesen (siehe Tabelle 36).

Abbildung 16: Vergleich der RT-Aktivität resistenter und sensibler HIV-1
(69 Stunden p.i. CEMx174-SEAP Zellen)



blau = Wildtyp, violett = 97-4527, rot = 99-108-K03, grün = 99-1408-K04, gelb = 99-1408-K05
(log-Skalierung)

Tabelle 36: Quantifizierung der RT-Aktivitäten rekombinanter HIV-1

Probe	mittlerer ct-Wert $x \pm 1s$ (n=2)	RT-Aktivität [U/ml]	p24-Ag [pg/ml]	RT-Aktivität [U/Viruspartikel]	Titer/ml	RT-Aktivität U / infektiöser Einheit
pNL4.3-1	16,61 ± 0,35	150	820.000	$2,3 \times 10^{-8}$	436.099	$3,4 \times 10^{-4}$
pNL4.3-2	19,83 ± 0,58	58	-	-	-	-
99-1408-K03	23,38 ± 0,72	15	147.200	$1,3 \times 10^{-8}$	21.257	$7,0 \times 10^{-4}$
99-1408-K04	23,48 ± 0,53	14	198.000	$0,9 \times 10^{-8}$	24.386	$5,7 \times 10^{-4}$
99-1408-K05	23,06 ± 0,65	18	148.000	$1,6 \times 10^{-8}$	21.257	$8,5 \times 10^{-4}$
97-4527-K12	18,29 ± 0,07	86	174.000	$6,3 \times 10^{-8}$	83.927	$10,2 \times 10^{-4}$
Standard	(n=6)					
Standard 1	33,73 ± 0,64	2				
Standard 2	30,15 ± 0,55	20				
Standard 3	23,65 ± 1,55	200				
Standard 4	15,01 ± 0,27	2000				

Die RT-Aktivität des HIV Klons 97-4527-K12 (AZT und DLV Resistenz) lag deutlich über den RT-Aktivitäten der multiresistenten Klone aus Probe 99-1408 (siehe Tabelle 36). Die sehr starken Unterschiede in den RT-Aktivitäten der beiden Wildtyp-Klone liegen wahrscheinlich an dem beobachteten Zellsterben 69 Stunden nach Infektion mit Viren der Probe pNL4.3-2, so dass hier zu niedrige Messwerten angenommen werden können. Zur nachfolgenden Standardisierung der gemessenen Werte wurden deshalb ausschließlich die Daten des Wildtypklons pNL4.3-1 verwendet. Die Aktivitäten der resistenten Reversen Transkriptase waren insgesamt deutlich geringer, als die des Wildtyp-Enzyms. Diese geringeren Enzymaktivitäten werden auf die resistenz-assoziierten Mutationen zurückgeführt.

Die Standardisierung der ermittelten RT-Aktivität auf RT-Aktivität in U/Viruspartikel anhand der p24-Antigen Konzentration der virushaltigen Zellkulturüberstände (siehe Kapitel 4.8.2) und der Annahme, dass 1 pg p24-Antigen 7800 Viruspartikeln entspricht (Grund 1991), ergab einen Unterschied in der Aktivität von resistenten HIV-1 RT im Vergleich zu Wildtyp RT (siehe Tabelle 36).

Die Daten zeigten eine starke Streuung, aufgrund der Empfindlichkeit der Methode. Ein Unterschied im ct-Wert von 0,5, der einem relativen Fehler von ca. 2% entspricht und innerhalb einer Mehrfachbestimmung auf Varianzen beruht, die durch die Aufarbeitung und das Pipettieren der Proben entstehen, ergab in den ermittelten Units der RT-Aktivität eine Varianz von 20%-25%.

Diese Art der Standardisierung der gemessenen RT-Aktivität der rekombinanten HIV-1 Virusstocks berücksichtigt nicht, ob es sich bei dem zur Umrechnung verwendeten p24-Antigen um partikelassoziiertes oder um freies Antigen aus zerfallenen Viren oder Zellen handelt. Deshalb wurde eine weitere Normierung der ermittelten RT-Aktivität der verschiedenen Viren auf den infektiösen Titer ($TCID_{50}/ml$) durchgeführt, so dass die Reverse Transkriptase Aktivität in Einheiten RT-Aktivität pro infektiöser Einheit angegeben werden konnte. Hier lagen die normierten RT-Aktivitäten/infektiöser Einheit der resistenten Enzyme im Vergleich zur Wildtyp-RT sogar höher (siehe Tabelle 36).

Unabhängig von der Art der Standardisierung der Messwerte konnten mit dieser Methode die RT-Aktivitäten nur als virologische Aktivitäten und nicht als Enzymaktivitäten gemessen werden, da keine gereinigten Proteine vorlagen. In den virushaltigen Kulturüberständen waren unterschiedliche Mengen Enzym enthalten, die sich eventuell in ihrer enzymatischen Aktivität unterschieden. Die Messung der RT-Aktivität im TaqMan mit *real time* PCR ist generell geeignet, RT-Aktivitäten in Viren zu erfassen und zu quantifizieren. Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität verschiedener Reverser Transkriptasen muss jedoch die Präparation der Enzyme noch modifiziert werden (siehe Kapitel 5.7).