

Aus der
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
(Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher)
der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt,
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ursachen unterschiedlicher Ergebnisse bei serologischer und genetischer
Subtypisierung von HIV-1-Proben

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Sabine Hanker
aus Rosenheim

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. F.-J. von Sonnenburg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Frösner
Prof. Dr. F.-D. Goebel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. M. Hölscher

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen
Prüfung: 07.10.2004

Inhalt	Seite
I EINLEITUNG	7
1 HIV und AIDS	7
1.1. Die Entdeckung von HIV und AIDS	7
1.2. Stand der HIV-Pandemie im Dezember 2002	8
1.3. Verlauf einer HIV-Infektion	9
1.3.1. Initialphase der Infektion	9
1.3.2. Phase der klinischen Latenz	11
1.3.3. Fortgeschrittene HIV-Infektion	11
1.4. Therapie der HIV-Infektion	11
2 Das Human Immunodeficiency Virus Typ	14
2.1. Genetische Charakterisierung	14
2.1.1. Aufbau des Viruspartikels	14
2.1.2. Genomorganisation	15
2.2. Genetische Vielfalt	16
2.2.1. Virus-envelope Gen und der „V3-loop“	16
2.2.2. HIV-Gruppen und Subtypen	17
3 Relevanz von Subtypen	19
3.1. Genotyp und Serotyp	19
3.2. Phänotyp	20
3.3. Second-Receptor-Systeme	21
3.4. Langerhans-Zell-Tropismus	22
3.5. Impfstoffentwicklung	23
4 Epidemiologie der HIV-Infektion	25
4.1. Weltweite Prävalenzdaten und Epidemiologie der Subtypen	25
4.1.1. Afrika	25
4.1.2. Asien	27
4.1.3. Amerika	29
4.1.3.1. Nordamerika	29

4.1.3.2.	Mittel- und Südamerika	30
4.1.4.	Australien	31
4.1.5.	Europa	32
4.1.6.	Weltweite Subtypenverteilung	34
4.2.	HIV in Tansania	35
II	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	36
III	MATERIAL UND METHODEN	38
1.	Methodischer Aufbau	38
2.	Epidemiologische Daten	39
3.	Untersuchungsmethoden	40
3.1.	Subtypisierung durch Sequenzierung der V3-loop-Nukleinsäuren	40
3.1.1.	DNA-Freisetzung	40
3.1.2.	Verschachtelte PCR (nested PCR)	40
3.1.3.	DNA-Reinigung	42
3.1.4.	Sequenzreaktion	43
3.2.	Heteroduplex Mobility Assay	45
3.3.	Peptid-gestützte Subtypisierung durch serologische Analyse von V3-Antikörpern	46
3.3.1.	ELISA von Behring (Marburg) und dem Pettenkofer-Institut, München (BEH)	47
3.3.2.	ELISA des Imperial College at St. Mary's Hospital, London (ICSM)	48
3.3.3.	ELISA des Georg-Speyer-Hauses, Frankfurt (GSH)	49
3.3.4.	ELISA der Université Françoise Rabelais, Tours Cedex (UFR)	49
3.4.	Qualitätssicherung der Untersuchungen	50
3.5.	Computersoftware	50
IV	ERGEBNISSE	51
1.	Epidemiologische Daten	51
2.	Genotypisierung mittels PCR und Sequenzierung	52

3.	Genotypisierung mittels HMA	55
4.	Ergebnisse der serologischen Analysen	56
4.1.	BEH-ELISA	58
4.2.	ICSM-ELISA	59
4.3.	GSH-ELISA	59
4.4.	UFR-ELISA	60
4.5.	Konkordanz der serologischen Untersuchungsmethoden	60
4.	Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse von serologischer und genetischer Subtypisierung	61
5.1.	Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps A	63
5.2.	Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps C	64
5.3.	Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps D	65
V	DISKUSSION	67
1.	Wertigkeit serologischer Tests	67
1.1.	Argumente für und gegen die zuverlässige Vorhersagekraft von serologischen Untersuchungsmethoden	67
1.2.	Evaluierung von Problemen der ELISAs durch den Vergleich von Ergebnissen mit einer Fremdstudie	69
2.	Wertung der Ergebnisse	71
3.	Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse bei serologischer und genetischer Subtypisierung	72
4.	Regionale Besonderheiten	73
5.	Schlussfolgerungen	75
VI	ZUSAMMENFASSUNG	77
VII	LITERATURVERZEICHNIS	79

I EINLEITUNG

1. HIV und AIDS

1.1. Die Entdeckung von HIV und AIDS

Im Jahr 1981 wurde eine neue Art von Immunschwächekrankheit bekannt. Die amerikanischen Gesundheitsbehörden verzeichneten bei jungen homosexuellen Männern eine ungewöhnliche Häufung von Krankheiten, die T-Zell-Versagen zur Voraussetzung hatten, beispielsweise Pneumocystis carinii-Pneumonien, generalisierte Herpes-Infektionen oder Kaposi-Sarkome [29]. Anfangs wurde als Ursache eine Schwächung des Immunsystems durch Geschlechtskrankheiten oder durch den andauernden Kontakt mit körperfremder Samenflüssigkeit angenommen [87].

1982 aber zeigten sich auch bei Haemophilen, Blut- und Blutproduktempfängern ebenso wie bei Drogenabhängigen und deren heterosexuellen Partnern und auch Kindern die oben beschriebenen Formen von Immunschwäche. Bald wurde deutlich, dass ein infektiöses Agens mitbeteiligt sein musste, und schon 1983 gelang die Isolierung eines T-lymphotropen Retrovirus (Human Immunodeficiency Virus) [13][68], das für die Krankheitsfälle verantwortlich gemacht wurde. Ein Jahr später war AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) als eigenständige Krankheit des Immunsystems infolge einer HIV-Infektion anerkannt [67].

1985 konnte der erste serologische Test zur Reihenuntersuchung von Blutspendern in Amerika eingeführt werden. Ein Jahr später lagen der Weltgesundheitsorganisation WHO 26746 gemeldete AIDS-Fälle weltweit vor. Zwei unterschiedliche Viren konnten bislang nachgewiesen werden, HIV-1 und HIV-2.

HIV-2 tritt gehäuft in der westafrikanischen Bevölkerung [36] und in einigen Teilen des portugiesisch sprechenden Afrikas - zum Beispiel Madagaskar - [43] auf und konnte 1986 erstmals isoliert werden. Es zeigt einen höheren Verwandtschaftsgrad zu dem bei Primaten Immunschwäche-induzierenden SIV (simian immunodeficiency virus) als zu HIV-1 und

zeichnet sich auch durch seine geringere Pathogenität und stabile Prävalenzraten aus [81][108][151].

HIV-1 ist weitaus infektiöser und pathogener und ist hauptsächlich für die weltweite Verbreitung von AIDS verantwortlich.

1.2. Stand der HIV-Pandemie im Dezember 2002

Die HIV-1-Pandemie setzt sich aus unterschiedlichen Epidemien zusammen, die sich in Abhängigkeit von den Bevölkerungsgruppen und den geographischen Regionen ausbreiten und auch einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf aufzeigen [153][154][164]. Von den ersten aufgetretenen Fällen 1981 bis Dezember 2000 wurden der WHO offiziell 2.312.860 AIDS-Fälle gemeldet. Da aber nicht in allen Ländern ein effizientes Meldewesen existiert oder aus politischen Gründen viele Krankheitsfälle nicht veröffentlicht werden, dürfte die wahre Zahl weit höher liegen. Nach Schätzungen des Joint United Nations Programme on HIV / AIDS (UNAIDS) und der WHO [www.unaids.org][4] haben sich allein im Jahr 2002 4,7 Millionen Erwachsene und 600.000 Kinder (unter 15 Jahren) neu infiziert. Demzufolge ist die Zahl der Gesamtkontaminationen seit Beginn der Epidemie auf 60 Millionen angestiegen. Seitdem diese Infektion bekannt ist, sind schätzungsweise 22 Millionen Erwachsene und Kinder an HIV und AIDS gestorben.

Bei Unterscheidung der Übertragungswege entfällt mit insgesamt etwa 70% der weitaus größte Anteil auf eine Ansteckung während des ungeschützten heterosexuellen Geschlechtsverkehrs; dahingegen können rund 8% der Infektionen auf homosexuellen Geschlechtsverkehr zurückgeführt werden. Von der vertikalen Übertragung durch Mütter auf ihre Kinder und dem gemeinsamen Benutzen von Injektionsnadeln bei Drogenabhängigen (IVDU) rührt ebenfalls je ein Anteil von durchschnittlich 8% her. Etwa 5% der Infektionen wurden bisher durch Transfusionen von HIV-positivem Blut oder Blutprodukten erworben [5]. Zur genaueren Analyse der Übertragungswege müssen aber die Industrie- und Entwicklungsländer getrennt voneinander betrachtet werden (siehe Abb.1).

	Hetero- sex.	Homo-/ Bisex.	IVDU	Blut	Perinatal	Andere
Europa / Nordamerika	33%	37%	27%	2%	2%	0%
Lateinamerika	64%	22%	6%	1%	5%	2%
Asien	69%	11%	16%	1%	2%	1%
Osteuropa	29%	27%	35%	1%	2%	6%
Nordafrika / Mittl.Osten	65%	10%	12%	10%	2%	0%
Ozeanien	48%	41%	4%	1%	7%	0%
Afrika südl. der Sahara	91%	0%	0%	1%	8%	0%

Abb. 1: Art der Übertragung bei gemeldeten AIDS-Fällen [222]

Welche Übertragungswahrscheinlichkeiten für die unterschiedlichen Infektionswege bestehen, kann aus Abbildung 2 ersehen werden.

Wahrscheinlichkeit der Infektion mit HIV nach einmaligem Kontakt:	
durch versehentliche Nadelstiche	0,004 - 0,1%
beim Geschlechtsverkehr	0,1 - 1%
durch Mehrfachverwendung von Spritzbestecken	0,5 - 1%
perinatal	13 - 50%
durch Bluttransfusionen	> 90%

Abb. 2 (adaptiert nach [169])

1.3. Verlauf einer HIV-1-Infektion

1.3.1. Initialphase der Infektion

Wenige Tage nach der Inokulation von HIV-Partikeln lässt sich das Virus in den Lymphknoten nachweisen. Im lymphatischen Gewebe liegen die Zellen der Immunabwehr gegen die Virus-Determinanten benachbart zu den Zielzellen der HIV-Infektion wie beispielsweise Makrophagen und CD4-positiven T-Lymphozyten. Dies führt zu einer initial rasanten Vermehrung von HIV und manifestiert sich in einer ausgeprägten Plasmavirämie, sowie dem Anstieg von HIV-Antigen p24 und infizierten mononuklearen Zellen im Blut. Die Virämie und die Verteilung von Viren in andere Organe - bevorzugt in die des lymphatischen

Systems - korreliert mit dem Auftreten erster klinischer Symptome. Diese zeigen sich meist in einem Mononukleose-ähnlichem Krankheitsbild mit Kopf- und Halsschmerzen, Fieber, Exanthem und generalisierter Lymphadenopathie. Relativ häufig bleibt diese Phase allerdings auch oligosymptomatisch [199].

Nach kurzer Zeit ist im Blut ein Rückgang der initial schnellen HIV-Replikation und Ausbreitung zu beobachten, was als Effekt der Immunantwort auf neu gebildete, HIV-spezifische T-Lymphozyten anzusehen ist. Die von CD8-positiven Zellen gebildeten Mediatoren scheinen ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Virusreplikation in der frühen Phase der akuten Infektion zu haben [16][148].

Beispiele für phasenspezifische Diagnosen	
Kategorie A: akute Infektion (asymptomatisch oder persistierende generalisierte Lymphadenopathie)	
Kategorie B: HIV-bezogene Krankheiten →	
bazilläre Angiomatose	thrombocytopenische Purpura
Candidiasis	Listeriose
cervicale Dysplasie	urogenitale Infektionen
Haarleukoplakie	periphere Polyneuropathie
Herpes zoster	allgemeine Krankheitszeichen länger als einen Monat
Kategorie C: AIDS-definierte Diagnosen →	
Candidiasis von Organen	Kaposi-Sarkom
Cervixcarcinom	Lymphome
Coccidiomykose	Mycobacterium-Infektionen
Cryptosporidiose	Pneumocystis carinii-Pneumonie
CMV-Infektionen	PCP
Encephalopathien	rezidivierende bakterielle Pneumonien
Herpes-simplex-Geschwüre	Salmonellensepsis
Histoplasmose	cerebrale Toxoplasmose
Isopsoriasis	Kachexie

Abb. 3: Klassifikation der HIV-Infektion nach dem Einteilungssystem des Center for Disease Control (Atlanta, USA; 1993) (nach [169])

1.3.2. Phase der klinischen Latenz

Sechs bis zwölf Wochen nach der Infektion können im Blut neutralisierende humorale Antikörper gegen HIV nachgewiesen werden („Serokonversion“). Mit der Serokonversion beginnt eine Phase der klinischen Latenz. Die Viruslast im Plasma ist gering, es findet sich kein p24-Antigen mehr, und der Patient fühlt sich im allgemeinen wohl. Es kann sich eine persistierende generalisierte Lymphadenopathie entwickeln [169]. Im Verlauf dieser Phase, die durchschnittlich 10 Jahre beansprucht und durch das Gleichgewicht zwischen Virusproduktion (täglich zwischen 10^6 und 10^{12} Viren) und Virusneutralisierung gekennzeichnet ist, nimmt die Zahl der CD4-tragenden Zellen langsam aber kontinuierlich ab. Die Viruslast steigt wieder an und p24-Antigen taucht erneut im Plasma auf, ohne dass dazu korrespondierende Antikörper gebildet werden. Damit wird die symptomatische Phase der Infektion eingeleitet. Abbildung 3 zeigt typische Diagnosen in den verschiedenen Krankheitsphasen.

1.3.3. Fortgeschrittene HIV-Infektion

Der durch den zunehmenden Verlust von CD4-T-Helferzellen hervorgerufene Immundefekt hat vor allem das Auftreten opportunistischer Infektionen und von - bei immunkompetenten Menschen seltenen - Tumoren zur Folge. Wie dramatisch die Erkrankung verläuft, hängt von der verbliebenen T-Zell-Anzahl ab, deren untere Normgrenze bei etwa 500 Zellen/ μ l Blut liegt. Bei Werten unter 200 CD4-positiven Zellen pro μ l Blut zeigt sich das Vollbild von AIDS. Die mittlere Überlebenszeit beträgt von da an ein bis drei Jahre.

1.4. Therapie der HIV-Infektion

Ein Konzept zur medikamentösen Behandlung der HIV-Infektion im Sinne einer viralen Suppression berücksichtigt die seit Beginn der spezifischen Pharmakotherapie gewonnenen Erfahrungen: So soll eine *Monotherapie* mit nur einem Medikament vermieden werden, da es ansonsten - wie auch bei der Behandlung bakterieller Problemkeime - schnell zur Entwicklung von Resistenzen kommen kann. Weiterhin sollte die Therapie *möglichst früh*

und nicht erst nach dem Auftreten von Symptomen begonnen werden, wobei als Richtlinie die Anzahl der CD4-Zellen von $<350/\mu\text{l}$ und/oder eine Viruslast von 25000 viralen RNA-Kopien/ml Plasma gelten. Eine strenge *Kontrolle* der Therapie ist unumgänglich - der wichtigste Parameter hierbei ist die Viruslast. Ziel der Therapie sollte es sein, die Virusproduktion unter die Nachweisgrenze von 200 Kopien pro ml Blut zu senken.

Eine *Kombinationstherapie* besteht aus mindestens zwei Nukleosidanaloga, die das virale Enzym Reverse Transkriptase zum Kettenabbruch zwingen. Hierzu stehen derzeit folgende Arzneistoffe zur Verfügung: Zidovudin, Zalcitabin, Didanosin, Stavudin, Lamivudin und Abacavir. Eine neuere Stoffklasse mit dem gleichen Ziel sind die nicht-nukleosidischen Inhibitoren der Reversen Transkriptase Nevirapin, Delavirdin und Efavirenz. Zu bevorzugen ist eine „hochaktive antiretrovirale Therapie“ im Sinne einer Tripeltherapie mit zwei Nukleosidanaloga und einem Hemmstoff der retroviralen Protease wie Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir oder Amprenavir, um die Herstellung der Viruspartikel zu stören [86][127][176]. Durch Kombination von Medikamenten, die untereinander keine Kreuzresistenzen verursachen, kann die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung von 10^{-4} bei der Monotherapie auf 10^{-12} bei der Mehrfachtherapie gesenkt werden. Allerdings verlangt die Mehrfachmedikation eine extrem hohe Patientencompliance, da strenge Einnahmemodalitäten für die einzelnen Tabletten gelten sowie ausgeprägte Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen, zumal zur Prophylaxe opportunistischer Infektionen oftmals zusätzliche Antiinfektiva eingenommen werden (siehe Abbildung 4). Problematisch dürfte sein, dass von dieser Therapie, die bereits gezeigt hat, dass damit die Viruslast über mindestens drei Jahre unter der Nachweisgrenze gehalten werden kann, nur wenige - genauer gesagt Betroffene in Ländern mit gut funktionierendem Sozialversicherungssystem - profitieren dürften. Der Grund dafür liegt in den hohen Kosten, denn in einem Jahr fallen für Medikamente und die begleitenden Untersuchungen bei einem Patienten bis zu € 25.000 an [64][239].

Noch in Entwicklung befinden sich Hemmstoffe der RNase H und der Integrase, die den Einbau des viralen Genoms in die Wirtszelle verhindern sollen und somit eine Replikation unmöglich machen. Da beide Enzyme typisch retroviral sind, erhofft man sich in Zukunft damit eine relativ nebenwirkungsarme Therapie. Einen weiteren Ansatz für künftige Arzneistoffe bieten außerdem die für die Virusinokulation nötigen Nebenrezeptoren wie

CCR-5 und der Fusin-Rezeptor CXCR-4. Diese Rezeptoren werden momentan als Ziele für Inhibitionsstrategien getestet [63].

Kontrovers diskutiert werden derzeit Konzepte zu strukturierten Therapiepausen, die möglicherweise zu einer verbesserten CD4-vermittelten speziellen Immunantwort führen könnten. Daneben wird durch große Studien gerade zu klären versucht, ob neben der rein immunsuppressiv wirkenden Pharmakotherapie die Zufuhr immunmodulatorischer Substanzen wie Interleukin 2 einen so positiven Effekt erbringt, dass die Belastung durch subjektiv schwere, grippeähnliche Nebenwirkungen in Kauf genommen werden sollten [90].

Auswahl an möglichen Nebenwirkungen der antiretroviralen Therapie:

Übelkeit, Erbrechen, Gastro-intestinale Störungen, Mundtrockenheit
Kopfschmerzen, Schwindel, Abgeschlagenheit
Exanthem
Blutbildveränderungen
Polyneuropathie
Myopathie
Pancreatitis
Insulinresistenz, Diabetes mellitus
Lipodystrophie, Dyslipidämien
Hypersensitivitätssyndrom
Lactatazidose
Metabolisierung vieler anderer Medikamente

Abb.4

2. Das Human Immunodeficiency Virus Typ 1

HIV ist neben den humanen T-lymphotropen Viren Typ I (T-Zell-Lymphom) und II (Haarzell-Leukämie) das dritte bisher entdeckte humanpathogene Retrovirus und entspringt der Reihe der Lentiviren. Es besteht eine Verwandtschaft mit dem SIV (simian immunodeficiency virus), welches bei verschiedenen Affenarten ebenfalls Immunschwächekrankheiten auslöst [14][85].

2.1. Genetische Charakterisierung von HIV-1

2.1.1. Aufbau des Viruspartikels

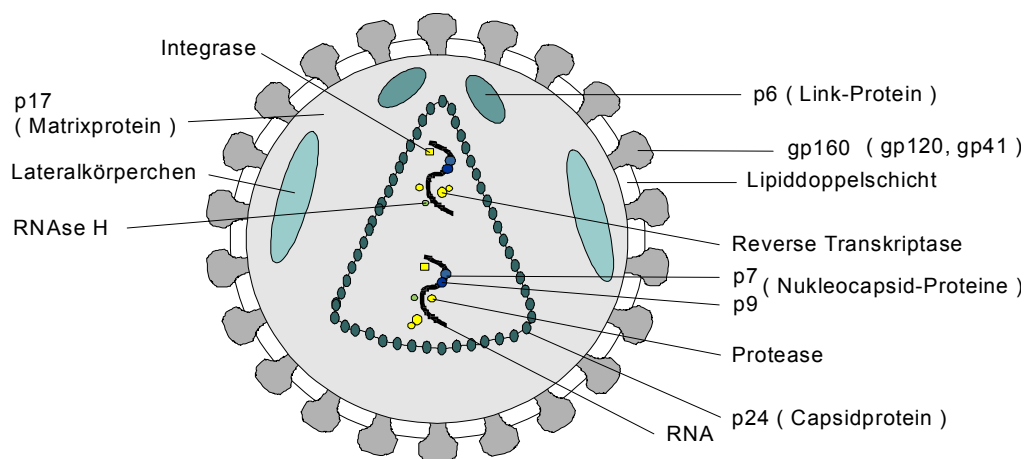


Abb.5

Schematische Darstellung eines HIV-1. Umgeben von einer Hülle aus einer Lipiddoppelschicht und den darin enthaltenen externen und transmembranalen Glycoproteinen (gp120 und gp41) findet sich das Capsidprotein p24, eingebettet in eine Schicht von Matrixprotein p17. Im konischen Capsid liegen zwei RNA-Genome, komplexiert von Nukleocapsidproteinen (p7, p9) und den viralen Enzymen. Das Link-Protein p6 stellt eine Verbindung zwischen der Hüllmembran und dem Capsid her, die Funktion der Lateralkörperchen ist unbekannt. adaptiert nach [155]

Das gesamte kugelige Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm. Dieses ist von einer Lipiddoppelschicht (zum größten Teil aus den Bestandteilen der Wirtszellmembran) als äußerer Hülle umgeben, aus der zweiteilige Proteinkomplexe herausragen, welche den Genprodukten von **env** (envelope) entsprechen. Eine Untereinheit, gp120, bindet als externes Glycoprotein an den CD4-Rezeptor von Zielzellen, während der andere, nicht-kovalent gebundene Teil, das Transmembranprotein gp41, eine Rolle bei der Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran spielt [14][38][135][155].

Gag (group antigenes) codiert zentrale Anteile von HIV: Matrixprotein p17 ist im reifen Virus mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden und bildet eine netzähnliche Proteinschicht, die dem Partikel eine isometrische Struktur verleiht. Es fördert den Transport von Virusgenom in den Zellkern und ermöglicht die Infektion ruhender Zellen [24][155]. Das Matrixprotein hüllt das virale Capsid p24 mit den Nukleocapsidproteinen p7 und p9 ein, welche wiederum an die zwei identischen Moleküle einzelsträngiger RNA binden. Außerdem findet sich ein Link-Protein p6 zwischen dem spitzen Ende des konischen Capsids und der Hüllmembran [155].

Im Capsid findet man neben dem Genom auch die durch **pol** (polymerase) codierten viralen Enzyme: Protease (zur Bearbeitung von Vorläuferproteinen), Integrase (mit Ligase- und Endonukleasefunktion), Reverse Transkriptase (Umschreibung von RNA in DNA) und RNase H (Abbau der viralen DNA-Matrix) [14].

2.1.2. Genomorganisation

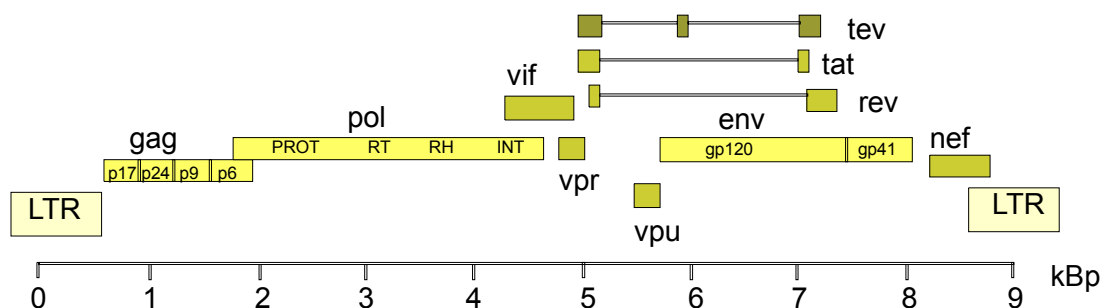


Abb.6

Genomaufbau von HIV-1. Die Exons der regulatorischen Proteine sind durch Querstriche miteinander verbunden. *tev*-Proteine werden alternativ zu kompletten *tat*-Proteinen aus dem ersten *tat*-Exon und Abschnitten aus *env* oder *rev* gebildet (*tev* = *tat*, *env*, *rev*). Angegeben ist jeweils der Umfang in Kilo-Basenpaaren (kBp). Adaptiert nach [84][155]

Neben den bereits erwähnten Strukturgenen, die allen Retroviren gemein sind, exprimiert HIV-1 weitere Proteine, die die Replikation und den Infektionsverlauf regulieren:

- **tat** (transactivator of transcription) erhöht die Transkription des LTR-Promoters (long terminal repeat) [39][84].
- **rev** (regulator of expression of virion proteins) reguliert und stabilisiert die mRNA [14].
- Die Funktion von **nef** (negative regulatory factor) ist noch umstritten, scheint aber wichtig für eine korrekte Replikation und die Virulenz der Viren zu sein.

- **vif** (viral infectivity factor) erhöht die Infektiosität und ist essentiell bei der Infektion von peripheren Blutlymphozyten [155].
- **vpu** (viral protein out) erleichtert den Transport von Viruspartikeln aus der Zelle.
- **vpr** (viral protein rapid) beschleunigt die Replikation [84].

2.2. Genetische Vielfältigkeit von HIV

Die einzelnen Gene von HIV unterscheiden sich unter anderem in ihrer Variabilität. Während *gag* und *pol* relativ konserviert bleiben, verändern sich *tat* und *rev* in geringem Umfang und *nef* sowie vor allem *env* gelten als besonders variabel [14].

2.2.1. Virus-envelope-Gen und der „V3-loop“

Innerhalb des Envelope-Gens kann man wiederum zwischen konservierten (C1-6) und variablen (V1-5) Domänen unterscheiden [156].

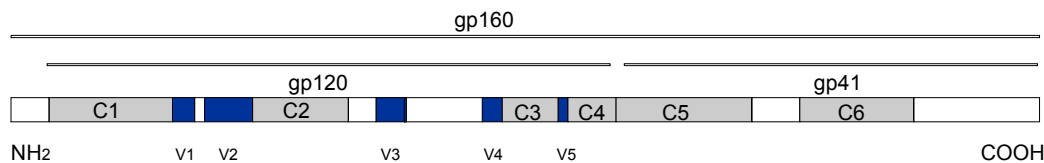


Abb.7

Glycoproteine des *env*-Gens von HIV-1. Die als gemeinsames Vorläuferprodukt synthetisierten Proteine (gp160) werden im Endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat durch eine Furin-Protease in gp120 und gp41 gespalten. Die Proteine sind in konservierte (C1-6, hellgrau) und hochvariable Domänen (V1-5, blau) unterteilt [155].

Die variablen Regionen sind im dreidimensional gefalteten Protein oberflächenexponiert und regen die Produktion gp120-spezifischer Antikörper an. In der dritten variablen Domäne (V3), die als einzige nicht glycosyliert ist, verbindet die Disulfidbrückenbildung zweier Cysteinreste 30-35 Aminosäuren zu einer Proteinschleife („V3-loop“). Im Zentrum dieser Schleife findet sich - in nahezu jedem einzelnen Virusgenom höchst konserviert - die Aminosäureabfolge Glycin-Prolin-Glycin (**GPG**) [105]. Die sich an beiden Seiten anschließenden Aminosäuresequenzen variieren aber zum Teil erheblich. Die V3-loop kommt besonders oberflächenexponiert zu liegen und wird somit in die Reaktionen von Wirt und

Virus einbezogen. Lang wurde vermutet, dass ein infizierter Organismus versucht, HIV vor allem durch V3-spezifische Antikörper zu neutralisieren [74][106][243]. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Verhalten auf Viren zutrifft, die in Zell-Linien kultiviert werden und nur in viel geringerem Umfang auch für primäre Virusisolate gilt [40][157]. Die Vermutung, dass Aminosäureänderungen in der Region V3 Zelltropismus [99][204], Infektiosität [66][75] und Pathogenität [46] beeinflussen können, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Zumindest aber induziert die V3-loop eine Immunreaktion, die stark genug ist, in einem serologischen Test nachgewiesen zu werden.

2.2.2. HIV-Gruppen und Subtypen

1992 wurden die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die die genetische Struktur diverser HIV-Stränge charakterisiert hatten, zusammengefasst. Es ließen sich Beziehungen zwischen den verschiedenen Genomsequenzen erkennen [162]. Aufgrund phylogenetischer Ähnlichkeiten im *env*-Gen konnten viele Viren in einer Gruppe M (major) zusammengefasst werden. Da sich die Viren untereinander aber um bis zu 35% in *env* und um ca. 14% in *gag* [143][162] unterscheiden, wurde eine weitere Einteilung in Subtypen nötig. Bisher sind 11 verschiedene Subtypen (A-K) von HIV-1 Gruppe M bekannt [14]. Von acht Subtypen gibt es inzwischen durch den Vergleich internationaler Isolate gewonnene Konsensussequenzen (siehe Abbildung 8). Innerhalb eines Subtyps bestehen Genomunterschiede bis zu 20% in *env*.

ST-A:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	V	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
ST-B:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
ST-C:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	T	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
ST-D:	C	T	R	P	Y	N	N	T	R	Q	R	T	H	I	G	P	G	Q	A	L	Y	T	T	-	R	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
ST-E:	C	T	R	P	S	N	N	T	R	T	S	I	T	I	G	P	G	Q	V	F	Y	R	T	G	D	I	I	G	D	I	R	K	A	Y	C
ST-F:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	L	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	K	A	H	C
ST-G:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	T	F	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
ST-H:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C

Abb.8: V3-loop-Konsensus-Sequenzen der HIV-Subtypen A bis H [163]

Die Heterogenität der HIV-Sequenzen wird bedingt durch zwei Mechanismen, von denen angenommen wird, dass sie dazu beitragen, dass das Human Immunodeficiency Virus dem Selektionsdruck des Immunsystems entkommen kann: Mutationen, begünstigt durch eine hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase (ca. 10^{-4} pro Base und Replikationsrunde) [183][191] [212] und Rekombinationen (2% pro Kilobase und Replikationsrunde) [97][212]. Bei Rekombinationen kann es zu einem Austausch von Genabschnitten des selben Virus kommen. Hierdurch bedingt können Deletionen oder Insertionen auftreten. Ist ein Individuum mit zwei oder mehreren HIV-Subtypen gleichzeitig infiziert, so kann es wiederum zu Rekombinationen zwischen den unterschiedlichen Subtypen kommen. In einigen Regionen der Welt, in welchen mehrere Subtypen nebeneinander über viele Jahre hinweg Bestand haben, können mehr als die Hälfte der vorkommenden Viren Rekombinanten von zwei verschiedenen Subtypen sein [95].

HIV-Stränge, deren Genom noch größere Abweichungen zeigt (bis 45% in *env*), wurden in der Gruppe O (outlier) zusammengeschlossen [30][79][80]. Die Viren dieser Gruppe sind für etwa 5% aller HIV-Infektionen verantwortlich [241] und wurden gehäuft bisher nur aus Kamerun, Gabon und der Zentralafrikanischen Republik gemeldet [80][139][226]. Außerhalb Westafrikas findet man HIV Gruppe O eher sporadisch [139][140][185][211].

1998 schließlich wurde die Einteilungsmöglichkeit für HIV noch um die Gruppe N erweitert. Bei epidemiologischen Untersuchungen in Kamerun zur Klärung der phylogenetischen Unterschiede der Gruppen M und O fand eine Arbeitsgruppe eine Patientenprobe, die im serologischen Test nur mit SIV-Antikörpern, nicht aber mit Gruppe M- oder O-Peptiden reagierte. Das Virus konnte isoliert werden und die phylogenetische Analyse zeigte, dass es zwar näher verwandt zu SIV als zu den beiden anderen HIV-Gruppen sein muss, sich aber letztlich nirgendwo einreihen lässt; somit kann es als Prototyp für eine neue HIV-Gruppe betrachtet werden [241].

3. Relevanz von Subtypen

3.1. Genotyp und Serotyp

Die HIV-Serotypisierung basiert auf dem Nachweis von Antikörpern im Patientenserum, die gegen einen immunologisch wirksamen Abschnitt des Virusgenoms gerichtet sind. Entsprechend der genetisch determinierten Subtypen von HIV besteht die Annahme, dass es auch subtypenspezifische Antikörper im Serum geben könnte [125][172][233]. Zuverlässige serologische Subtypisierungsergebnisse würden unter anderem eine Möglichkeit darstellen, die geographische Verteilung von Subtypen schnell und kostengünstig zu erfassen. Bei dem Klassifizierungsversuch mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) können aber in verschieden hohem Maße immer wieder Abweichungen des Ergebnisses von der Subtypeneinteilung infolge genetischer Analyse beobachtet werden. Im Gegensatz zur Sequenzierung, einer Methode, bei welcher man mit Genomabschnitten von mehreren Hundert Nukleotiden arbeitet, müssen serologische Tests bei der Suche nach Antikörpern mit 14- bis 17-stelligen Peptiden beziehungsweise 42 -51 Nukleotiden auskommen. Sind in dieser geringen Spanne eventuell einige kritische Aminosäurereste konserviert, kann es zur Ausbildung einer nicht unerheblichen Kreuzreaktivität kommen, vornehmlich zwischen den Subtypen A und C [119], in etwas geringerem Umfang aber auch zwischen B und D [31].

Weiterhin spielt es auch eine Rolle, ob die Antikörper eines asymptomatischen Patienten, dessen Infektion noch nicht lang zurückliegt, untersucht werden, oder ob der Patient bereits unter einem Vollbild von AIDS leidet. Die anfangs breite Vielfalt an Antikörpern wird im Zuge der Immunschwächung eingeschränkt, und die Wahrscheinlichkeit, dass die noch zirkulierenden V3-Antikörper mit den entsprechenden synthetischen Peptiden eines Tests reagieren, nimmt ab [231][232].

Auch die geographische Herkunft der Viren kann die zuverlässige Zuordnung von Genotyp und Serotyp erschweren. Afrikanische Stränge zeigen eine erheblich größere Sequenzvielfalt als die meisten Viren, die in industrialisierten Ländern vorkommen. Antikörper gegen die V3-Region passen dann unter Umständen nur ungenau zu den für den Test ausgewählten Peptiden [104][163][237].

3.2. Phänotyp

Nachdem beobachtet wurde, dass HIV-2 im Vergleich zu HIV-1 weniger leicht übertragbar und weniger pathogen ist, und die Infektion außerdem längere Zeit symptomarm verläuft [43][108][151], wurde angenommen, dass es auch innerhalb der HIV-1-Isolate unterschiedliche phänotypische Eigenschaften gibt, da Genomabschnitte zum Teil erheblich variieren [60]. Schon bald nach Beginn der Auseinandersetzung mit den Eigenschaften einzelner HIV-Isolate konnten Unterschiede beobachtet werden, die die Replikation und den zytopathischen Effekt in vitro betreffen [11][33][58][195][213]. Bei 50% der infizierten Patienten entwickelt das Virus im Krankheitsverlauf neue Phänotypen, die den Progress zu AIDS beeinflussen [61][83][110][116][118][214]. Die frühe, asymptomatische Phase der HIV-Infektion ist gekennzeichnet durch eine geringe Viruslast im Plasma [89] sowie geringe infizierte Zellzahlen im peripheren Blut [117]. Nachweisbar sind häufig Virusvarianten, die keine Synzytiumbildung induzieren, sich langsam in Makrophagen und weniger in T-Lymphozyten vermehren [201] [229]. Während des Krankheitsfortschritts kommt es zum Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb des V3-loops und damit zur Änderung der biologischen Phänotypen: Verändert sich der Ladungszustand des V3-loops durch Vermehrung saurerer oder basischer Aminosäuren, so kann es zum einen zu einer Konformationsänderung der V3-Region kommen, die dazu führt, dass neutralisierende Antikörper nicht mehr binden können [65][66][158]. Weiterhin führt basischer Aminosäure-Ersatz an Position 11 und 25 innerhalb des V3-loops zur Vermehrung der Synzytium-induzierenden Virusvariante; außerdem bewirkt eine höherer Ladungszustand dieser Region eine höhere Affinität zu T-Zell-Linien und den schnelleren Abfall der T-Lymphozyten, was sich klinisch im Progress zu AIDS bemerkbar macht [47][61][117][213] [201]. Neben dem V3-loop nehmen an der Beeinflussung des Phänotyps auch noch andere Regionen von *env* teil, wie beispielsweise V1, V2 und gp41 [8][15][19][76][205][230].

Die Bedeutung der Subtypen für die Zuweisung unterschiedlicher biologischer Verhaltensweisen der Viren ist nach wie vor ungeklärt. Synzytium-induzierende Eigenschaften sind aber nachweisbar bei Subtyp D häufiger zu finden als bei anderen Subtypen [44][46][243].

3.3. Second-Receptor-Systeme

Es wurden Fälle von Menschen bekannt, die sich trotz hohem Risiko und wiederholter Exposition nicht mit HIV-1 infiziert hatten [37][130][175][193]. Nach dem Ausschluss von stochastischen Zufällen und den Fällen von ungewöhnlich stummen Infektionen blieben 2 Personen, deren Zellen sich in Kulturen nur mit einem extrem hochkonzentrierten Inokulum infizieren ließen, wobei sich die Viren anschließend aber nicht weiter vermehren konnten. Sie konnten nicht in neue Zielzellen eindringen [175].

CD4-positive Zellen

Immunsystem	T-Helfer-Lymphozyten, Monozyten / Makrophagen, dendritische Zellen
Gehirn	Mikroglia
Haut	Langerhans-Zellen
Verdauungstrakt	Darmzellen in vitro
Leber	Kupffer-Zellen in vitro

Abb.9 (nach [169])

1984 wurde gezeigt, dass das CD4-Rezeptormolekül beim Viruseintritt in die Zelle eine herausragende Rolle spielt [41][113] (siehe Abbildung 9). Schon 1986 tauchten Hinweise auf, dass die Bindung des viralen gp120-Oberflächenproteins an CD4-positiven Zellen allein nicht für einen suffizienten Viruseintritt ausreicht [149]. Nach fast einem Jahrzehnt bestätigte sich jetzt der Verdacht, dass es Korezeptoren auf den Zelloberflächen geben muss, die die Anheftung von Viren und somit die Infektion erleichtern: **CXCR-4** (verwandt mit Interleukin-8-Rezeptoren) als Second Receptor für HIV-Stränge, die an das Wachstum in T-Zell-Linien adaptiert sind [59], Synzytium induzieren und im späteren Infektionsverlauf zusätzlich zu anderen Korezeptoren bei fast allen Erkrankten auftreten; außerdem **CCR-5** (β -Chemokin-Rezeptor) als Second Receptor für HIV-Stränge mit Makrophagentropismus beziehungsweise keinem Synzytium-induzierenden Effekt [7][34][50][54][55][242] sowie bei HIV-2-Infektionen [53]. Ein genetischer Defekt mit Deletion von 32 Basenpaaren im CCR-5-Gen sorgt bei homozygoter Ausprägung dafür, dass die Ansteckungswahrscheinlichkeit erheblich gesenkt wird [137]. Heterozygote Anlageträger können sich zwar infizieren, doch wird vermutet, dass der Krankheitsprogress erheblich verlangsamt wird [45][98]. Der Schutz ist allerdings nicht komplett, wie Fälle von HIV-1-infizierten homozygoten Anlageträgern der

CKR-5-Deletion belegen [17][170][215]. Im Fall von Makrophagentropismus kann die Überproduktion von β -Chemokinen (Makrophagen Inflammatorisches Protein MIP-1 α und MIP-1 β ; weiterhin RANTES -„regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted“-) Zellen vor der Infektion mit HIV schützen.

Derzeit wird überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen den einzelnen Subtypen und einer jeweils spezifischen Nutzung von Corezeptoren gibt [220][242].

3.4. Langerhans-Zell-Tropismus

Die ungleiche Subtypenverteilung zusammen mit unterschiedlichen Hauptübertragungsmodi in verschiedenen Ländern (USA und Europa: vor allem Subtyp B / homosexuell und Drogen; Thailand: insbesondere Subtyp E / heterosexuell; Indien: vor allem Subtyp C / heterosexuell; Afrika: vorwiegend A, C, D / heterosexuell) gab Grund zu der Annahme, dass sich einige Subtypen besser auf heterosexuellem Weg erwerben lassen als andere. Zur Untersuchung dieser biologischen Eigenschaft wurden Langerhans-Zellen herangezogen: dendritische CD4-positive, Antigen-präsentierende Zellen mesenchymaler Herkunft, die in der oralen und genitalen Schleimhaut, an Teilen der Zervix, nicht aber im Analkanal [131] vorkommen. Diese Zellen wandern nach Antigenaufnahme zu regionalen Lymphknoten und wirken dort immunstimulierend. Dadurch könnte eine Synzytiumbildung mit T-Zellen angeregt und infolge dessen die Infektion auf replikationsfähige Zellen übertragen werden.

Bisher wurden allerdings keine übereinstimmenden Untersuchungsergebnisse vorgelegt. In der Arbeit von Soto-Ramirez et al. [210] zeigten Viren der Subtypen B und E, die sich beide in peripheren Blutmonocyten gut vermehrten, in den Langerhans-Kulturen unterschiedliches Verhalten. Die Subtyp E-Viren von heterosexuell Infizierten hatten eine deutlich erhöhte Affinität zu den Schleimhautzellen, vermehrten sich schnell und verhielten sich nicht Synzytium-induzierend, wohingegen die Subtyp B-Viren homosexuell Infizierter ein viel geringeres Vermehrungsverhalten aufwiesen. Die Untersuchungen anderer Gruppen ergaben entweder keinen Unterschied der einzelnen Subtypen in einer effizienteren Unterhaltung der HIV-Infektion durch Langerhans-Zellen [52] oder lediglich Strang-spezifische, aber keine Subtypen-abhängige Assoziation mit einer gesteigerten Virusreplikation [181].

3.5. Impfstoffentwicklung

Das größte Problem bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen den Erreger von AIDS liegt bei der extremen Variabilität des HIV-Genoms [240]. Obwohl potentiell alle Bestandteile des Virus immunogen wirken, konzentrieren sich die ersten Antworten des Immunsystems nach einer Infektion besonders auf die Struktur des V3-loops. Die Verschiedenartigkeit des V3-loops bei den einzelnen Viren bringt die Schwierigkeit mit sich, dass ein Impfstoff entwickelt werden müsste, der gegen das ganze Spektrum von HIV wirkt. Zusätzliche Schwierigkeiten dürfte die Subtypenheterogenität in den Ländern mit den höchsten HIV-Inzidenzen und dem größten Bedarf an Präventivmaßnahmen bereiten, denn hier ergeben sich mehr und mehr Möglichkeiten zur Rekombination und somit zur Entstehung von Virusvarianten, gegen die selbst geimpfte Personen keinen Schutz haben würden. Seit 1987 wurden über 40 in Frage kommende Substanzen als Impfstoffe in klinischen Prüfungen getestet.

Ältere Überlegungen zum Schutz vor HIV, die *env*- und somit Varianten-unabhängiger sind, zielten auf die Modelle ab, dass eine HIV-2-Infektion möglicherweise vor einer Superinfektion mit HIV-1 schützt [216], oder dass SIV-Stämme mit einer *nef*-Deletion Makaken vor einer anschließenden Infektion mit pathogenen Wildtypen bewahren [42][126].

Neuere Bemühungen gelten dem Erarbeiten eines Impfstoffes, der eine möglichst breite Antwort von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) hervorbringt. Bei Langzeitüberlebenden findet man beständig hohe Spiegel an CTL [83][114][180][192][203]. Auch nichtinfizierte Personen, die nachweislich einer Ansteckungsgefahr ausgesetzt waren, könnten durch eine CTL-Immunität geschützt sein [178][193]. Schließlich besteht der zeitliche Zusammenhang zwischen dem Abfall der Plasmavirämie und dem Auftreten cytotoxischer T-Lymphozyten [124]. Es hat sich außerdem gezeigt, dass einige CTL-Epitope subtypenunabhängig konserviert sind: CTL von nicht-Subtyp-B-Patienten waren in der Lage, Subtyp B-markierte Ziele zu zerstören [28]. Auf der anderen Seite konnte ein Vakzine, das auf der Basis von Subtyp B CTL induzierte, in drei von vier Freiwilligen Ziele lysieren, die mit verschiedenen HIV-Isolaten markiert waren [62]. Dies lässt hoffen, dass die Suche nach einem Impfstoff, der sowohl bei Varianz zwischen verschiedenen Subtypen als auch innerhalb eines Subtyps wirksam ist, erfolgreich sein kann [18][83][120]. Das Auffinden weiterer wirkungsvoller

Epitope, die als Vakzine eine möglichst umfassende Immunreaktion bewirken, sollte als eines der wichtigsten Nahziele in der Impfschutz-Forschung angesehen werden.

Eine weiteren Ansatz verspricht man sich von neutralisierenden, monoklonalen Antikörpern, deren Wirksamkeit in Tiermodellen nachgewiesen wurde [36][133][173][211]. 1996 wurde beispielsweise Schimpansen ein Impfstoff inokuliert, der neutralisierende Antikörper vom Subtyp B induzierten sollte. Die Tiere konnten erfolgreich vor einer Infektion durch einen anderen Subtyp B-Virus geschützt werden. Bei der Infektion mit Subtyp E versagte der Impfschutz [71][72]. Bisher existieren nur drei Varianten, die zum einen die Primärisolate neutralisieren können und weiterhin die Eigenschaft einer breiten Kreuzreaktivität zeigen, um vor möglichst vielen Virusvarianten zu schützen [22][23][25][111][219]. Die Immunglobuline G1b12 und 2G12 verhindern die gp120-Interaktion mit dem Korezeptor CKR-5 [218]; 2F5 erschwert durch Konformationsänderung in Domänen von gp41 und gp120 den Zugang zu den CD4-tragenden Zellen [166][198].

Wenn auch die Entwicklung von erfolgreichen, prophylaktisch wirksamen Impfstoffen noch nicht abzusehen ist, so setzt man derzeit Hoffnung in immunomodulatorisch wirksame Substanzen, die durch eine Steigerung der CD4+-Lymphozyten zumindest die Viruslast bzw. die Replikationsrate des HIV-Genoms senken [138].

4. Epidemiologie von HIV

4.1. Weltweite Prävalenzdaten und Epidemiologie der Subtypen

Die HIV-Pandemie verläuft extrem heterogen, sowohl die Ausmaße ihrer Verbreitung als auch den zeitlichen Verlauf betreffend; des weiteren bestehen erhebliche regionale Unterschiede in der Verteilung der Gruppen und Subtypen. 90% aller HIV-Infektionen treten in Entwicklungsländern auf. Der folgende Überblick basiert auf Daten der „Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS“, die bis Ende Juni 1996 erhoben wurden [2][5][150] sowie der „UNAIDS/WHO Global AIDS Statistics“ [4] von Ende 2002 und den Schätzungen der WHO zur weltweiten Verbreitung der HIV-Infektion vom Dezember 2002.

4.1.1. Afrika

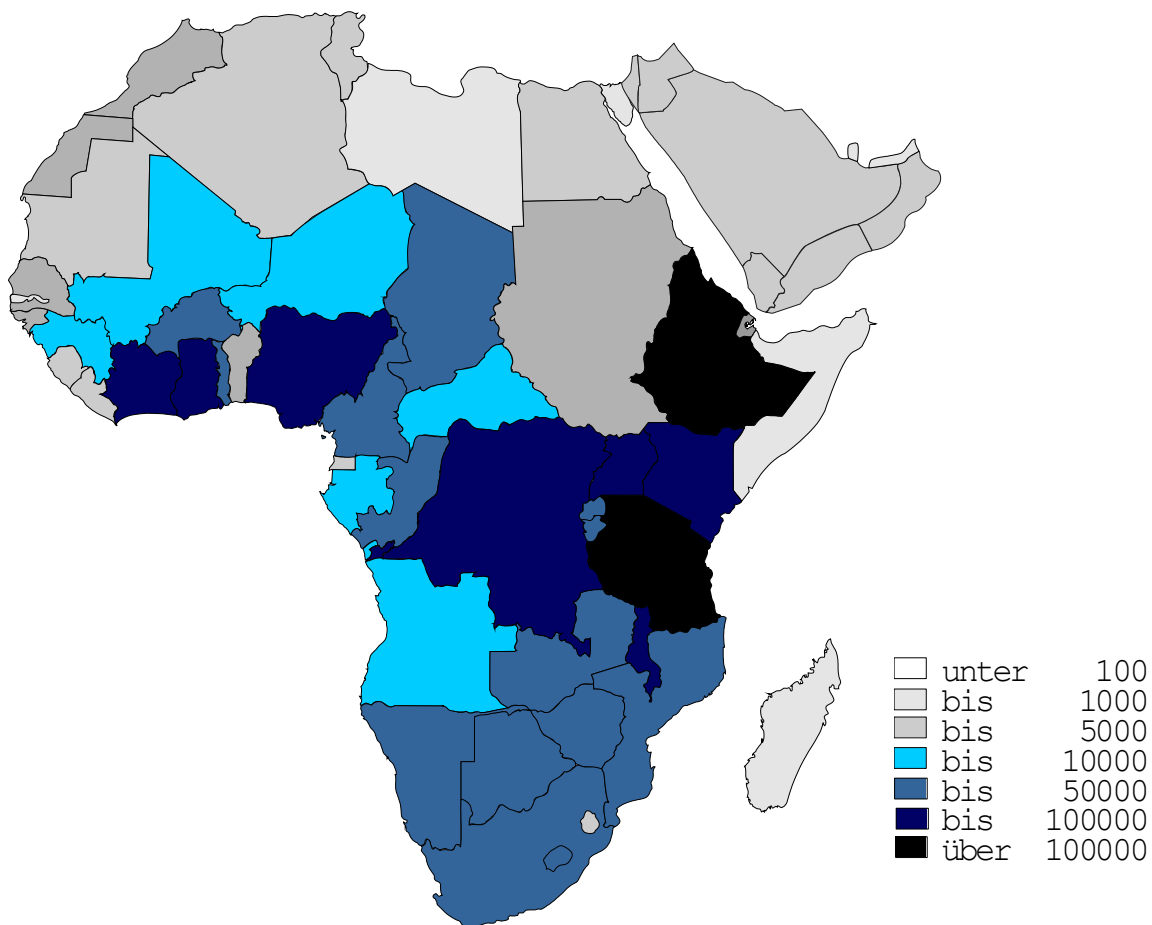


Abb. 10

Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in den Ländern Afrikas (Stand: November 2002).

Afrika - und besonders der südlich der Sahara gelegene Teil - ist mit insgesamt 28.5 Millionen infizierten Menschen der von der HIV-Pandemie bisher am stärksten betroffene Kontinent. Rund 70% aller angesteckten Erwachsenen und 80% der Kinder, die mit HIV leben, finden sich hier. Die Prävalenzraten variieren regional zum Teil erheblich, bieten im Süden und im Osten höhere Werte und gipfeln in größeren Städten (beispielsweise Abidjan oder Kampala) teilweise bis zu Anteilen von 40% [190][225]. In einigen Städten und ländlichen Gemeinden von Uganda und Tanzania gilt AIDS als die führende Todesursache [159][203]. Hingegen herrschen in den vom Islam geprägten Ländern Nordafrikas insgesamt recht niedrige Fallzahlen von höchstens 440.000 Erkrankten; ein Trend, der sich auch in den Mittleren Osten fortsetzt. Kritisch anmerken muss man hierzu allerdings, dass zum einen zwischen 1994 und 1999 aus diesen Ländern nur sehr mangelhafte Daten erhoben werden konnten, und dass zum anderen die nun vorliegenden Daten wegen der im Islam geltenden strengen moralischen Regeln nicht uneingeschränkt Glauben geschenkt werden darf. Erworben wird der größte Teil der Infektionen in Afrika durch heterosexuellen Geschlechtsverkehr. Daneben wirken sich die hohen Erkrankungszahlen bei Frauen im gebärfähigen Alter aus (bis zu 10% der Schwangeren sind HIV-positiv) und führen durch vertikale Übertragung zu nicht unerheblichen Zahlen infizierter Neugeborener (durchschnittlich bringen die Frauen im 16. Lebensjahr ihr erstes Kind zur Welt). Bisher sind in Afrika über 17 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion verstorben.

In Afrika findet man, bedingt durch die bereits lang andauernde Infektion, beinahe alle Gruppen und Subtypen von HIV: in Westafrika und in den portugiesisch-sprechenden Ländern HIV-2 [42][73][151]; HIV-1 Gruppe O in West- und Zentralafrika [80]; Gruppe N wurde in einer Probe aus Kamerun entdeckt [206]. Entlang eines breiten Ost-West-Gürtels tauchen die Subtypen A und D der HIV-1 Gruppe M gehäuft auf; Subtyp C dominiert einen Nord-Süd-Streifen an Afrikas Ostflanke; die übrigen HIV-1 Subtypen (B, E, F, G, H, K) findet man breit verstreut, ohne dass sie prävalent erscheinen [3][21][103][107][142][161][168][182][217][237].

Zur Dynamik der Infektionsausbreitung in Afrika lässt sich keine Gesamtprognose abgeben. Regional, vor allem dort, wo jetzt die höchsten Prävalenzraten herrschen, scheint der Höhepunkt bereits erreicht zu sein, da die durch ihr Verhalten gefährdeten Menschen bereits infiziert sind. Andere Bevölkerungsgruppen dagegen werden durch neu angelaufene

Präventionsmaßnahmen besser informiert und können sich gezielter schützen (Beispiel: in Uganda wurden seit 1990 im AIDS Information-Centre von Kampala 350.000 Menschen vertraulich beraten und getestet). Anderenorts wiederum gibt es sowohl langjährig niedrige als auch neuerdings zunehmende HIV-Prävalenzen. Beispielsweise stieg die Infektionsrate im Süden des Kontinents erst in den letzten Jahren stark an und könnte in kurzer Zeit zur Vervielfachung der Infektionsraten führen [190].

4.1.2. Asien

In Asien begann die Epidemie erst in den späten achtziger Jahren und zählt bisher über 7 Millionen Infizierte. Bedenkt man, dass auf dem asiatischen Kontinent mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung beheimatet ist, berücksichtigt man die enorme Ausbreitungsgeschwindigkeit der Krankheit und geht man davon aus, dass die Infektion hier erst begonnen hat, dann scheint es durchaus möglich zu sein, dass sich das Zentrum der Epidemie in den nächsten Jahren insgesamt von Afrika hierher verschieben wird. Des weiteren bereiten die in Asien zum Teil weit verbreiteten Geschlechtskrankheiten und die regional hohen Anteile an Prostituierten einen guten Boden für die HIV-Epidemie [128][238].

Das Potential, das in dieser Region der Erde hinsichtlich neuer Infektionsraten besteht, lässt sich eindrucksvoll am Beispiel von Thailand zeigen: hier stieg die Seroprävalenz für HIV in den Jahren 1988-91 von 1,2% auf 45% [152][184][235]. In Teilen Indiens und Malaysias vollzieht sich jetzt das Infektionsgeschehen nach dem thailändischen Muster, gemäß welchem sich ein schneller Anstieg der HIV-Prävalenz unter Drogenkonsumenten zeigt, begleitet vom Zuwachs unter den Prostituierten; anschließend folgt der Einzug in heterosexuellen Bereich [190]. In Thailand selbst greifen offensichtlich Präventivmaßnahmen, denn die Inzidenzen fallen [82]. In anderen Teilen Südostasiens wie auf den Philippinen und den Malediven, in Indonesien und Sri Lanka herrschen noch geringe Prävalenzen vor [190]. Auch in Nordostasien ist die Situation bei Fallzahlen von 640.000 recht heterogen. Während z.B. in der Mongolei sehr niedrige Prävalenzen bestehen, werden in Kambodscha und Vietnam beängstigende Zuwachsraten beobachtet (32% zwischen 1992 und 1995 bei vietnamesischen Drogenabhängigen) [165]. In China hat die Epidemie gerade erst begonnen. Drei Viertel der dort aufgetretenen Infektionen konzentrieren sich auf die südliche Provinz Yunnan, die im Grenzgebiet zu Laos und Myanmar (Prävalenzen bei Drogenabhängigen zwischen 43% und

82%) [184], den Hauptumschlagplätzen für Heroin liegt. Da in der chinesischen Bevölkerung eine hohe Migrationsbereitschaft nachweisbar ist, sind die Voraussetzungen für eine Zunahme bei den Infektionen günstig. Als Vorzeichen ist der Anstieg der seit den 60er Jahren nahezu ausgerotteten Geschlechtskrankheiten zu sehen.

Für die Subtypenverteilung gilt, dass bei Drogenkonsumenten der HIV-1 Subtyp B, bei den durch heterosexuellen Geschlechtsverkehr erworbenen Infektionen der Subtyp E dominiert [171][236]. In China findet man auch Subtyp C [147]. In Indien herrscht Subtyp C vor, es sind aber auch Infektionen mit A, B, D und HIV-2 bekannt [102][177][193].

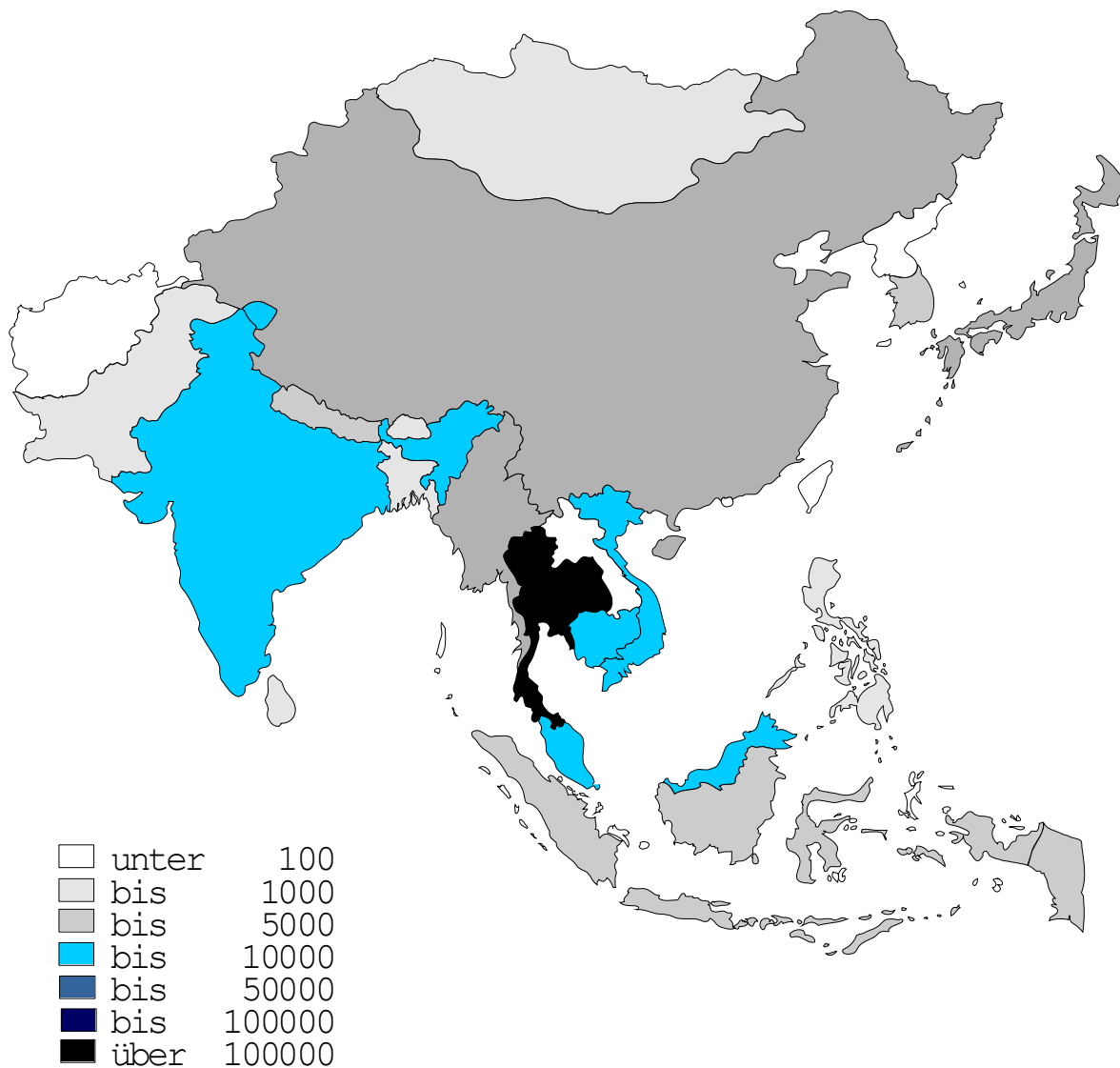


Abb. 11
Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in den Ländern Asiens (Stand: November 2002)

4.1.3. Amerika

4.1.3.1. Nordamerika

Nordamerika befindet sich mit 45.000 Neuinfektionen im Jahr 2000 und somit 920.000 Infizierten auf einem insgesamt langsamer gewordenen Kurs, was v.a. dem Rückgang an Neuinfektionen im homosexuellen Bereich zuzuschreiben ist, obwohl dieser neben den Drogenkonsumenten einst Auslöser für die Epidemie war. Verhältnismäßig dazu angestiegen ist allerdings der Anteil von Übertragungen durch heterosexuellen Geschlechtsverkehr und damit auch die Rate von Frauen, von jungen Menschen auf niedrigem sozioökonomischem Status und der Einzug in eher ländliche Gebiete. Der Rückgang von Todesfällen um nahezu zwei Drittel kann in einem wohlhabendem Land wie den Vereinigten Staaten den neuen Kombinationen der antiviralen Therapie angerechnet werden. Auch sogenannte „Schadensminderungsprogramme“ helfen mit AIDS-Aufklärung, Verteilung von Kondomen und Injektionsbestecken und sogar der Ausgabe von Methadon, die Zahl der Neuinfektionen zu senken. HIV-1-Subtyp B dominiert die nordamerikanische Situation, in geringem Umfang tauchen jetzt aber auch die Subtypen A, D, E und Gruppe O auf [10][20][35][50][69][96].

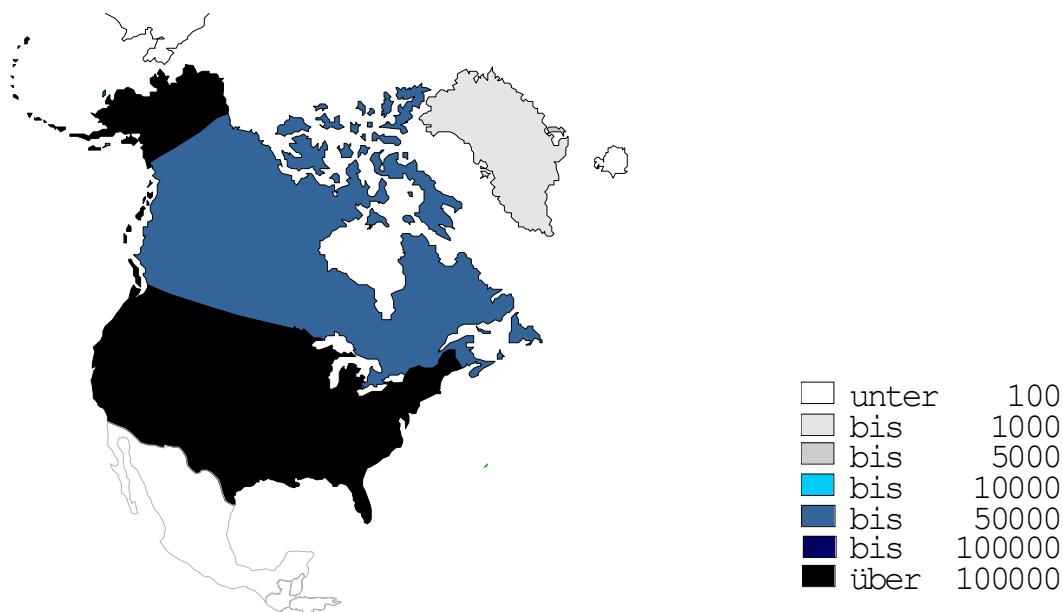


Abb. 12

Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in den Ländern Nordamerikas (Stand: Dezember 2002).

4.1.3.2. Mittel- und Südamerika

1,5 Millionen Infektionen finden sich in Zentral- und Südamerika zusammen mit der Karibik bei insgesamt langsameren Verbreitungsgeschwindigkeiten als in Asien oder Afrika. Obwohl die Situation der einzelnen Länder dieser Regionen recht unterschiedlich ist, zeigt sich auch eine Verschiebung des Schwerpunkts von homo- zu heterosexuellen Kontakten und von der Stadt ins Land, wodurch eher steigende Inzidenzen erwartet werden [27]. Infektionen in der mittelamerikanischen Region steigen bereits an, einige Karibikinseln zeigen außerhalb Afrikas die weltweit höchsten Raten an Neuinfektionen [190].

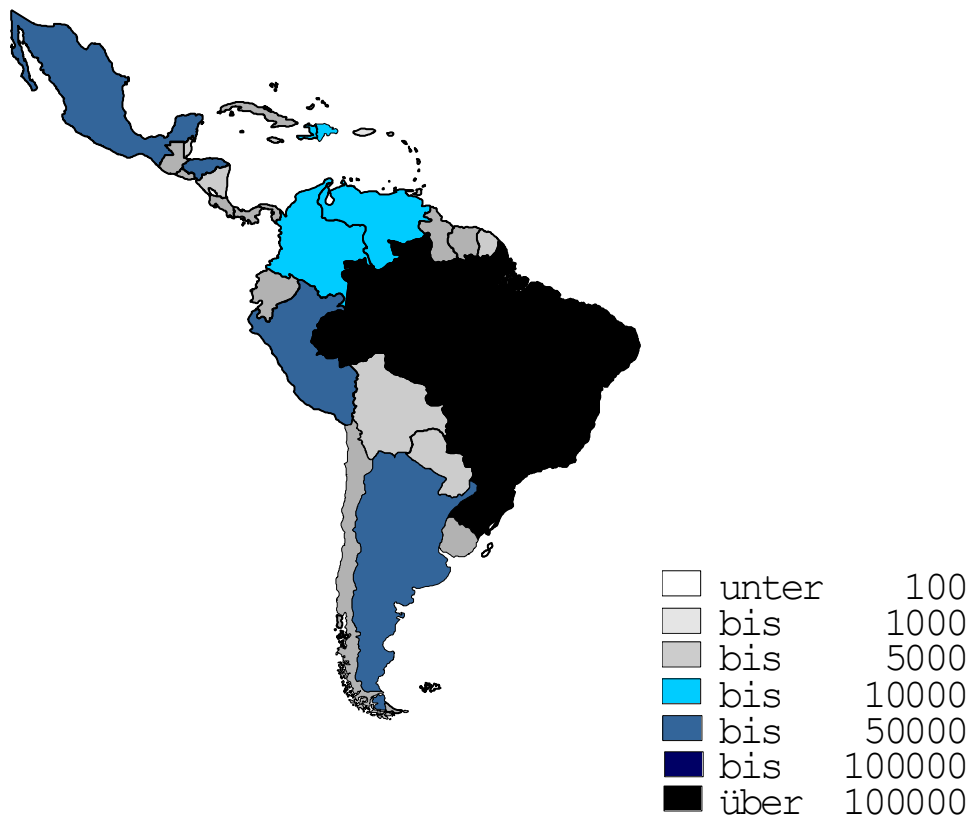


Abb. 13

Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in den Ländern Mittel- und Südamerikas (Stand: November 2002).

Bei den Subtypen herrscht wiederum B vor, in Brasilien jedoch fanden sich auch Fälle von C, F und B/F-Rekombinanten [26][141][196][237].

4.1.4. Australien

Rund 50.000 HIV-Infektionen gibt es bereits in der Gegend des westlichen Pazifiks und Australien, wobei ein Drittel der Fallzahlen auf den Kontinent selbst und auf Neu Seeland entfällt. Hier verläuft die Epidemie nach westlich-industriellem Muster (mit 85% der Infizierten im homo-/ oder bisexuellen Bereich) und der HIV-1 Subtyp B herrscht vor. Im Jahr 2000 kam es zu 500 Neuansteckungen. Der übrige Teil der Infektionen findet sich auf den pazifischen Inseln. Die Prognosen für die Länder im Pazifik sind durch den ständig wachsenden Tourismus, Handel und das Wanderungsverhalten der Bevölkerung eher pessimistisch [184].

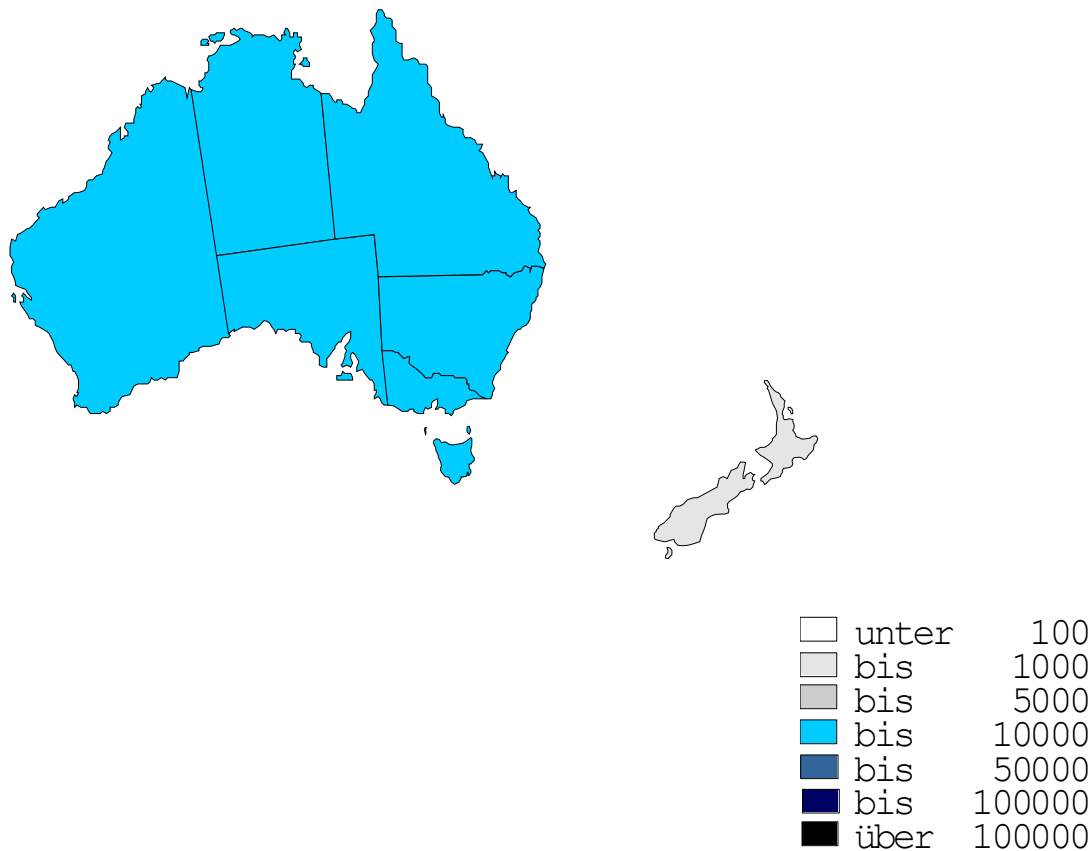


Abb. 14

Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in Australien und Neuseeland (Stand: November 2002).

4.1.5. Europa

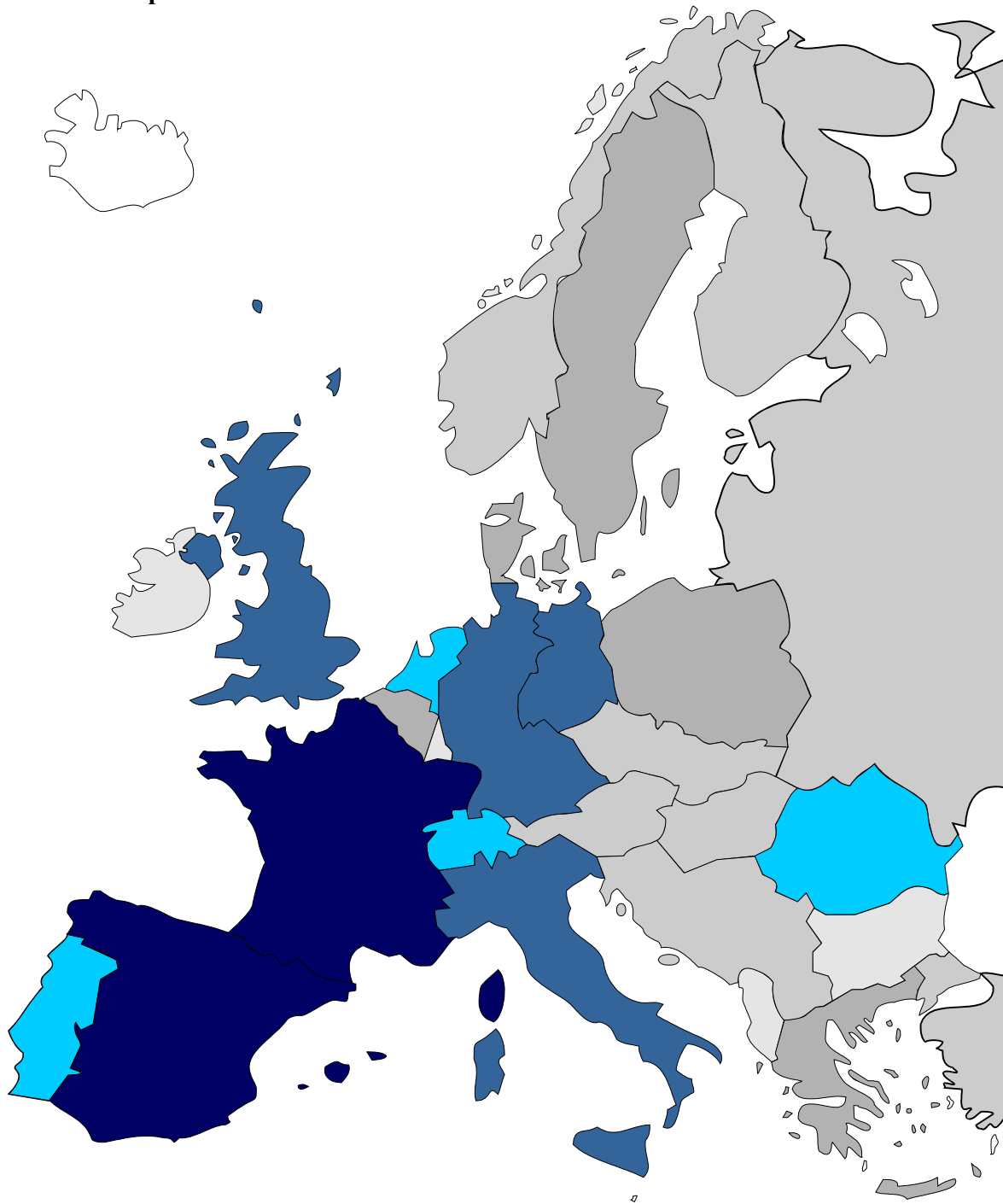


Abb. 15
Offiziell gemeldete HIV-Erkrankungen in den Ländern West- und Osteuropas (Stand: November 2002).

Für die epidemiologische Betrachtung der infizierten Personen sollte Europa in mehrere Gebiete unterteilt werden. In Westeuropa begann die Epidemie in den frühen achtziger Jahren unter den Homosexuellen (Subtyp B) und stabilisierte sich mit 30.000 Neuinfektionen im Jahr 2000 vor allem im Nordwesten, nicht aber im Südosten (v.a. Spanien und Italien), wo sich jetzt der Schwerpunkt ins Drogenmilieu verschoben hat. Bei insgesamt 540.000 Betroffenen ist der Anteil von infizierten Heterosexuellen hier größer als in Amerika, der Frauenanteil liegt bereits über 20%. In Deutschland leben circa 50.000 HIV-Infizierte, 18.239 AIDS-Fälle sind offiziell gemeldet. In einigen Ländern Westeuropas wurden alle bislang bekannten Erscheinungsformen des Virus nachgewiesen [208]; HIV-1 Subtyp I kennt man aus Zypern [121], Subtyp J fand man bei in Schweden lebenden Immigranten aus Zaire [132], und HIV-1 Gruppe O ist in Frankreich bekannt [139].

Osteuropa einschliesslich der Länder der ehemaligen Sowjetunion war bis in die neunziger Jahre bis auf wenige homosexuelle oder nosocomiale Fälle vor einer großen Infektionswelle verschont geblieben [55][179]; seit der Wende in Politik und Handelsbeziehungen aber steigt bei sozioökonomischer Instabilität zusammen mit Drogenkonsum, gewerblichem Sex und Geschlechtskrankheiten auch die Zahl der HIV-Neuinfektionen bei einer Gesamtzahl von 700.000 Betroffenen. In der ehemaligen UdSSR fanden sich im Jahr 2000 mehr Neuinfektionen als seit Beginn der Epidemie zusammengenommen. Dramatisch steigen die Inzidenzen in Ländern wie Usbekistan und Estland. Andererseits wurden durch die politischen Reformen auch Möglichkeiten der Öffentlichkeitsarbeit gegeben, die unter dem kommunistischen Regime undenkbar gewesen wären. So laufen jetzt beispielsweise neben Aufklärungskampagnen auch offiziell Langzeitüberwachungen von Risikogruppen.

In Osteuropa bietet sich das Spektrum aller bisher bekannter Subtypen einschließlich der seltenen F, G, H und I [77][115].

4.1.6. Weltweite Subtypenverteilung

Die größte Varianz an HIV-Subtypen findet sich in Zentralafrika. In den meisten Ländern Europas und Nordamerikas begann die Epidemie mit Subtyp B; inzwischen steigt aber in allen Regionen der Erde die Vielfalt der nebeneinander vorkommenden genetischen Subtypen und Gruppen von HIV [6][9][57][144]. Die in den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.5. bereits erwähnten Subtypenverteilungen sind in Abbildung 16 nochmals graphisch zusammengefaßt.

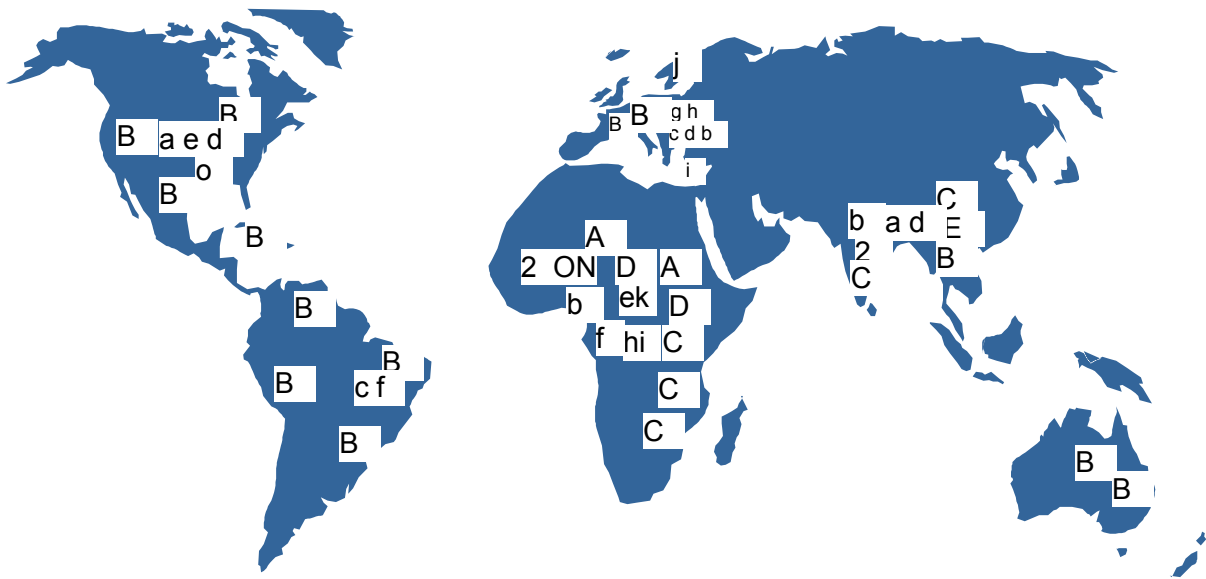


Abb.16

Übersicht der weltweiten Verteilung von HIV Subtypen (nach [212]).

4.1.7. HIV in Tansania

Tansania, ein etwa 945.000 km² großes Land im Osten Afrikas, wurde von der HIV-Epidemie schnell und schwer getroffen: bei einer Bevölkerung von über 32 Millionen Menschen lag nach Schätzungen Mitte 1992 die Zahl der Infizierten bei 800.000, gegen Ende 1995 aber schon bei mindestens 1,3 Millionen (4%). Selbstverständlich fällt die regionale Verteilung etwas unterschiedlich aus, wobei auf die urbanen Gegenden, wo rund 25% der Bevölkerung anzutreffen sind, die wesentlichen Anteile entfallen [1]. Bis November 1999 wurden 112.052 AIDS-Fälle offiziell gemeldet [4]. Allein 1999 sind 140.000 Erwachsene und Kinder in Tansania an den Folgen einer HIV-Infektion gestorben.

Das Wissen um die Krankheit und über die Infektionsmöglichkeiten ist relativ groß, wie schon eine 1994 durchgeführte Umfrage zeigte: 99% aller Stadtbewohner hatten schon etwas über HIV/AIDS gehört, 90% kannten die Übertragungswege und wußten, daß auch ein gesund aussehender Mensch infiziert sein kann; 63% konnten eine Person aus ihrem Bekanntenkreis benennen, der HIV-positiv war [234]. 1996 kannten fast 80% aller Einheimischen mindestens zwei Möglichkeiten, sich vor einer Ansteckung zu schützen [221]. Im Zuge der Infektion ließ sich eine Veränderung im Sexualverhalten dahingehend beobachten, daß verheiratete oder ältere (>25 Jahre) Männer nun weitgehend monogam lebten [167] und Frauen häufiger auf die Verwendung von Kondomen bestanden [221]. Die höchsten Inzidenzen von HIV-Infektionen treten nach wie vor durch heterosexuellen Geschlechtsverkehr bei jungen Frauen in städtischen Regionen auf [109]. Infektionen durch Blutübertragungen sowie perinatale Infektionen nehmen einen deutlich geringeren Stellenwert ein. Eine HIV-Übertragung durch Injektionen kann auch in einem Land wie Tansania durch einfachste Ausrüstung der medizinischen Einrichtungen und dem entsprechenden Hygienebewußtsein auf weniger als 0,4% der Gesamtinzidenz begrenzt werden [92].

Durch die geographische Nachbarschaft zu Ländern mit höchsten HIV-Prävalenzen und der größten Subtypen-Vielfalt wie Uganda, Kenia, Malawi, Sambia und Zaire ist in Tansania ein buntes Bild an HIV-Varianten zu erwarten, zumal sowohl Handel und Verkehr als auch Flüchtlingsbewegungen aufgrund politischer Unruhen in diesen Teilen der Erde für einen regen Austausch von Virusgenom sorgen dürften.

II FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Als Grundlage zur Impfstoffentwicklung und zum Verständnis der Epidemiologie von HIV ist eine Beschreibung der globalen Subtypenverteilung von essentieller Bedeutung. Bis heute gibt es kaum Studien zur Charakterisierung der HIV-Subtypen, in welchen eine statistisch signifikante Anzahl von Proben unter epidemiologischen und systematischen Gesichtspunkten zusammengetragen wurden. Technische Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Subtypen stellen unter anderem einen Grund hierfür dar.

Untersuchungsmethoden, die eine Differenzierung der HIV-Subtypen auf Sequenzebene erlauben (Sequenzanalyse, Heteroduplex Mobility Assay - HMA, Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus - RFLP), erfordern eine Amplifizierung des Virusgenoms mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und sind infolge dessen von hochwertigem Ausgangsmaterial wie gereinigte Monozyten aus peripherem Blut oder Serum in ununterbrochener Kühl- bzw. Gefrierkette abhängig. Dies ist bei Feldstudien, insbesondere in Entwicklungsländern, oft sehr schwer zu erreichen. Weiterhin sind die oben genannten Tests sehr zeitaufwendig, kosten-intensiv und bislang noch nicht automatisierbar.

Aus diesen Gründen hatte man zu der Zeit, als diese Arbeit begonnen und der experimentelle Teil durchgeführt wurde, große Hoffnung auf serologische Methoden zur Subtypisierung gesetzt. Hierbei wird die Differenzierung nicht auf Sequenzebene vorgenommen, sondern es werden die Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der gegen HIV gerichteten Antikörper bestimmt. Da diese Antikörper in einfachen Tests (ELISA) nachzuweisen sind, ist diese Methode relativ schnell und kostengünstig; weiterhin ist das nötige Testmaterial relativ stabil, und so ist auch bei nicht optimalen gelagerten Proben eine Testdurchführung möglich.

Schon zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die serologische Methoden bei der Subtypisierung von HIV gewisse Limitierungen haben. Als Ziel der Ausführungen sollten anhand eines Panels von Serumproben aus Tansania die Ergebnisse aller zu dieser Zeit in Entwicklung befindlichen V3-loop ELISAs miteinander verglichen werden. Zusätzlich sollte die Übereinstimmung der Testresultate mit dem Goldstandard der Sequenzanalyse verglichen und Gründe für etwaige Fehlbestimmungen gefunden werden.

Nach der Analyse der verschiedenen Methoden sollte eine Strategie erarbeitet werden, welche für die Subtypenerfassung in Regionen mit heterogenen Virusvarianten am besten geeignet zu sein scheint.

Im Zuge der Untersuchungen konnte außerdem ein erster Überblick über die Subtypenverteilung im südwestlichen Tansania erwartet werden. Andere Studien konzentrierten sich vor allem auf die HIV-Situation im nördlichen Teil des Landes [78][112][167][188][200][223]. Die Ergebnisse der Genotypisierung könnten als Ausgangsmaterial für Langzeituntersuchungen über etwaige Veränderungen der regionalen Subtypenvorkommen genutzt werden.

III MATERIAL UND METHODEN

1. Methodischer Aufbau

90 Blutproben, die im Dezember 1995 von symptomatischen AIDS-Patienten des Mbeya Referral Hospital im südwestlichen Tansania abgenommen wurden, waren als Ausgangsmaterial bereits vorhanden. Die Leukozyten aus dem peripheren Blut (PBL) waren mittels Ficoll-Gradient isoliert, zweifach in PBS-Puffer gewaschen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte im HIV-Labor des Max-von-Pettenkofer-Instituts, München entsprechend dem in Abbildung 17 gezeigtem Algorithmus.

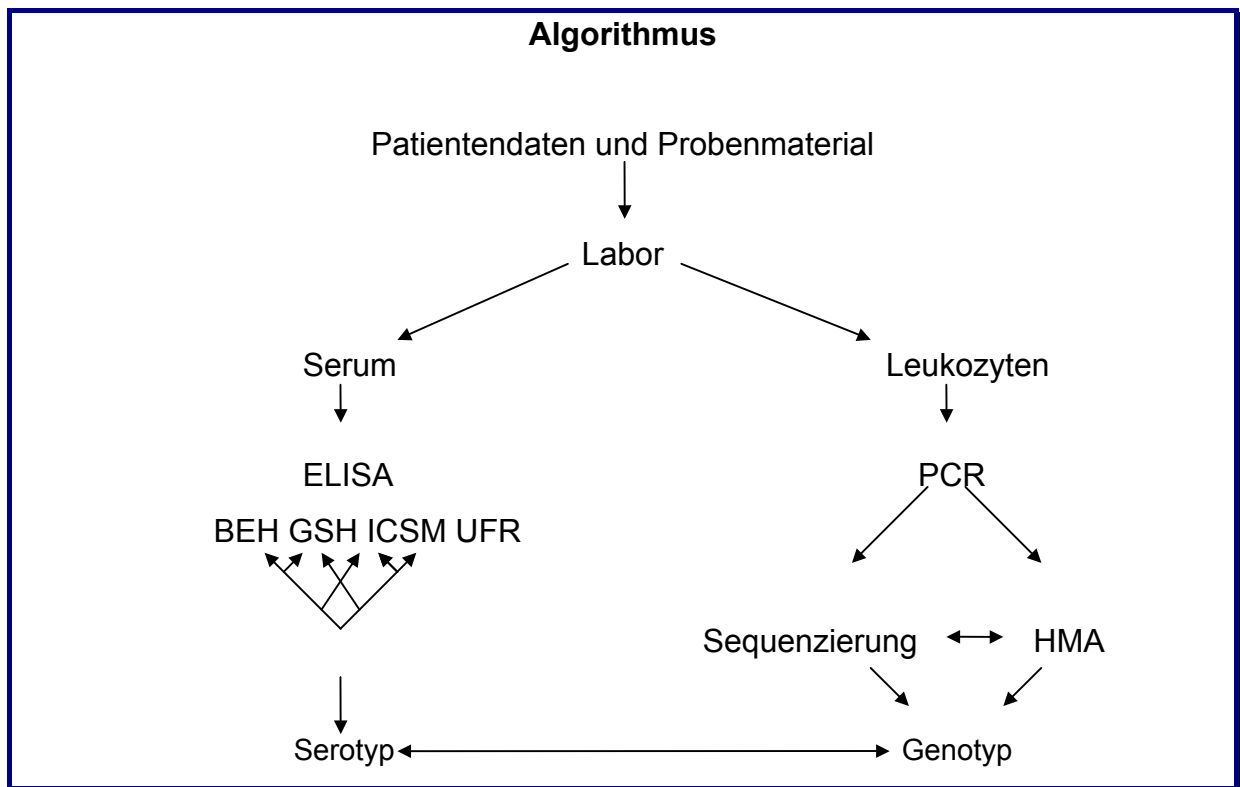


Abb. 17

Zur Bestimmung der genetischen Subtypen, wurde die HIV-tragende DNA aus den Leukozyten durch die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert und ein ca. 350 Nukleotid langer Teil der C2-V3-Region aus dem env-Gen sequenziert. Stichprobenartig wurden einige Proben ebenfalls mittels Heteroduplex Mobility Assay (HMA) weiterverarbeitet. Mit dem Serum der Patienten wurden jeweils 4

verschiedene Enzyme Linked Immunosorbant Assays (ELISAs) durchgeführt. Ihre Ergebnisse wurden untereinander und mit den Resultaten der beiden direkten DNA-Nachweismethoden verglichen.

2. Epidemiologische Daten

Alle zu bearbeitenden Proben stammen von Patienten aus der Mbeya-Region im Süden Tansanias (siehe Abbildung 18). Die Region stellt mit über 1,5 Millionen Einwohnern 6% der Bevölkerung des Landes und fällt durch ihre Grenznähe zu Sambia und Malawi, beides Länder mit hohen HIV-Prävalenzen, auf. In Tansania liegt der Anteil der Infizierten bei mindestens 5%.

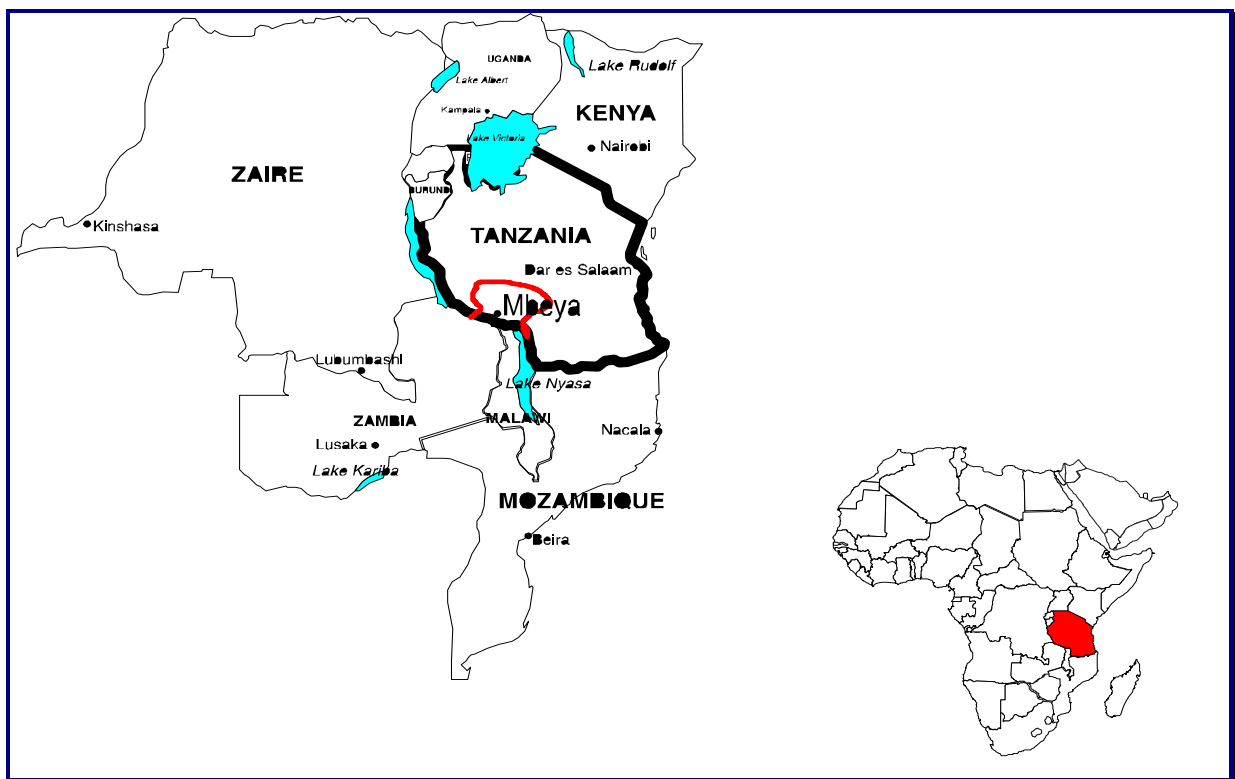


Abb.18

Zusätzlich zum Untersuchungsmaterial waren von den 90 in dieser Studie erfassten Patienten anhand eines standardisierten Fragebogens persönliche Angaben erhoben worden. Diese

berücksichtigten Alter, Geschlecht und Herkunft des Patienten sowie verschiedene bereits aufgetretene Symptome von AIDS.

3. Untersuchungsmethoden

3.1. Subtypisierung durch Sequenzierung der V3-loop-Nukleinsäuren

3.1.1. DNA-Freisetzung

Aus 100µl Patientenmaterial wurde die Leukozyten-DNA nach zweimaligem Reinigen mit je 500µl Aqua dest. extrahiert, indem die Zellen 1 Stunde lang mit 50µl *Puffer A* (100M KCl, 10mM Tris-HCl / pH 8.3, 2,5mM MgCl₂), 50µl *Puffer B* (10mM Tris-HCl / pH 8.3, 2,5mM MgCl₂, 1% Tween 20, 1% NP 40) und 12µl (24µg) *Proteinase K* bei 60°C inkubiert wurden. Durch zusätzliche 10 Minuten bei 95°C wurde die Proteinase schließlich wieder degeneriert.

3.1.2. Verschachtelte PCR (nested PCR)

Für die von Kary B. Mullins [160] entwickelte enzymatische Vervielfältigung von Genomabschnitten wurden 7µl *Aqua dest.*, 14µl *Desoxyribonucleotidtriphosphate* (dNTPs), 2µl WHO / NIH-Primer *ED 3* (5'-TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG) und 2µl *ED 14* (5'-TCTTGCCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC) zusammenpipettiert und mit einer Wachskugel versiegelt. Auf die Wachsschicht wurden 10µl *Aqua dest.*, 5µl *Puffer No.1* (Boehringer), 0,75µl *Taq-Polymerase* (Boehringer) und 10µl *DNA* hinzugefügt. So konnte die PCR heiß gestartet werden, denn beide Gemische vereinigen sich unmittelbar vor ihrer „Arbeitstemperatur“. Die Reaktion umfasste 30 Zyklen, wobei ein Durchlauf im Perkin Elmer Thermocycler 9600 10 Sekunden bei 92°C, 30 Sekunden bei 50°C und 2 Minuten bei 68°C betrug.

Die nun etwa 2000 Basenpaare langen Amplifikate wurden einer zweiten PCR zugeführt, welche als Produkt möglichst DNA-Stücke von etwa 350 Basenpaaren Länge hervorbringen sollte. Dazu wurden 5µl *Puffer No.1*, 8µl *dNTPs*, 17µl *Aqua dest.*, 0,5µl *Taq-Polymerase* und je 5µl der Primer *ED 33* (5'-TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC) und *ES 7* (5'-

TGTAACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCTAGC) mit 10µl 1:10 verdünntem Produkt der ersten PCR gemischt und in 30 Runden (30 Sekunden bei 92°C, 30 Sekunden bei 50°C und 2 Minuten bei 72°C) amplifiziert. Der Produktnachweis erfolgte mittels Gelelektrophorese von 4µl Amplifikat in 1,5% TBE-Gel (0,5g Agarose, 30ml 1-fach TBE-Puffer / 45mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8.0; 45 Minuten Laufzeit bei 75 Volt) und Anfärbung mit Ethidiumbromid.

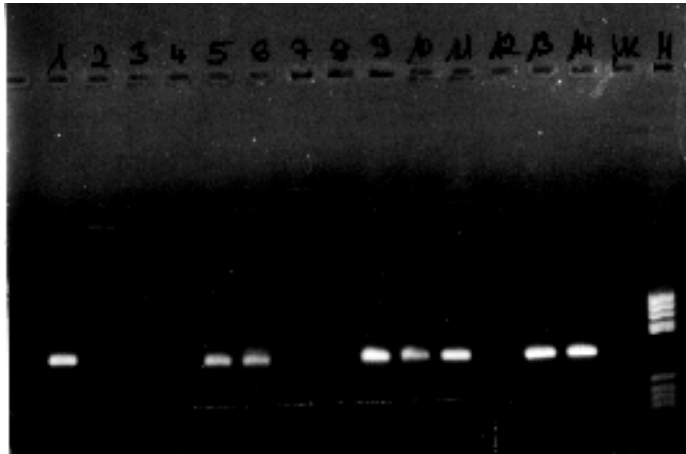


Abb. 19

Produktnachweis einer „nested“ PCR in Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel. Rechts außen wurden ein DNA-Längenstandard aufgetragen, links davon lief eine Negativkontrolle. Bei den 14 Proben konnte in 8 Fällen genügend Virusgenom aus den peripheren Lymphozyten amplifiziert werden (erkennbar an den hellen Banden).

Bei Patientenmaterial, für das keine oder sehr wenig Virus-DNA nachweisbar war, wurde eine dritte PCR-Runde durchgeführt, die vollkommen analog zur Zweiten war. Konnte danach immer noch kein Virusgenom nachgewiesen werden, obwohl der Schnelltest die Probe als HIV-positiv identifiziert hatte, wurde eine neuer Versuchsreihe von der DNA-Freisetzung an durchgeführt. Bei weiterhin unbefriedigendem Ergebnis schien es sinnvoll, einen Versuch mit anderen Primerpaaren zu unternehmen: 5' env 59 (GTCATTACACAGGCCTGTCC) und 3' env 1273 (CATGTGGCAGGAAGTAGGA) dienten als äußere Primer, für die inneren Abschnitte wurde zu 5' env 72 (GCACAGTACAATGTACACATGGAA) und 3' env 107 (CCTCAGGAGGGGACCCAGAA) gewechselt. Die übrigen Reaktionsparameter blieben unverändert. Als letzte Alternative blieb danach die PCR mit den eben genannten Primern und einer anderen DNA-Polymerase (Pharmacia). Dazu mussten die Mengen der übrigen Reaktionsteilnehmer geringfügig verändert werden (1. Runde: 5µl Pharmacia-Puffer, 8µl dNTPs, je 5µl der äußeren Primer, 0,5µl Pharmacia-Polymerase, 20µl Aqua dest. und 7µl DNA aus den Leukozyten; 2. Runde: 5µl Pharmacia-Puffer, 8µl dNTPs, je 5µl der inneren

Primer, 0,5µl Pharmacia-Polymerase, 22µl Aqua dest. und 5µl PCR-Produkt der ersten Runde). Auch die Thermocycler-Bedingungen änderten sich etwas (1. und 2. PCR jeweils: 30 Zyklen à 1 Minute bei 92°C, 1 Minute bei 50°C und 2 Minuten bei 72°C).

3.1.3. DNA-Reinigung

In einer Elektrophorese durch 2% TEA-Gel (0,6g Agarose, 30ml TEA-Puffer / 40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8.0) wurde die DNA während einer Stunde bei 60 Volt in einem Gelabschnitt konzentriert.

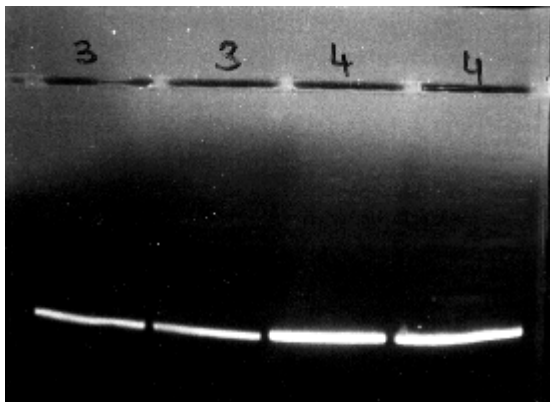


Abb. 20

Die Produkte der „nested“ PCR wurden je Patientenprobe in 2 Portionen geteilt und in großen Agarosegel-Banden konzentriert.

Die entsprechenden Bereiche wurden mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und mit dem Agarose Gel DNA Extraction Kit von Boehringer / Mannheim bearbeitet. Dieser ermöglicht die Reinigung der DNA von beispielsweise freien Nukleotiden, Salzen oder Proteinen. Dazu wird den Proben je nach Gewicht pro 100 mg Agarosegel 300µl *Agarose-Lösungspuffer* zugesetzt. Außerdem werden 10µl gut aufgeschüttelte *Silica-Suspension* zugegeben; wiegt die Agarosegelbande mehr als 2,5 µg, so wird die Menge an Silica-Suspension pro µg um 4 µl erhöht. Diese Mischung wird bei 60°C 10 Minuten lang inkubiert, wobei sie alle 3 Minuten gevortext wird. Anschließend wird sie mindestens 30 Sekunden bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wonach der Überstand im Reaktionsgefäß verworfen wird. Das übrig gebliebene Pellet wird mit 500 µl *Nukleinsäure-Bindungspuffer* gevortext und ebenfalls mindestens 30 Sekunden bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Wieder wird der Überstand verworfen; das Pellet wird nun mit 500 µl *Waschpuffer* gevortext und wiederum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Derselbe Schritt wird nochmals durchgeführt. Anschließend wird vorsichtig alle Flüssigkeit mittels

einer Pipette entfernt und die Proben sollen bei 37°C langsam trocknen. Dieser Schritt ist beendet, wenn die Silica-Matrix in heller, weißer Farbe erscheint (nach mindestens 30 Minuten). Mit 40 µl Aqua dest. wird diese gevortext und anschließend 10 Minuten bei 60°C inkubiert, wobei wiederum alle 3 Minuten gevortext wird. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 15000 Umdrehungen pro Minuten wird der Überstand abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße mit dem Pellet können verworfen werden.

Die Konzentration der DNA wurde durch Vergleich der Fluoreszenzbanden von 2 µl gereinigtem Amplifikat und einem Längenstandard-Marker in einer neuen TBE-Gel-Elektrophorese (1 Stunde, 75 V) ermittelt.

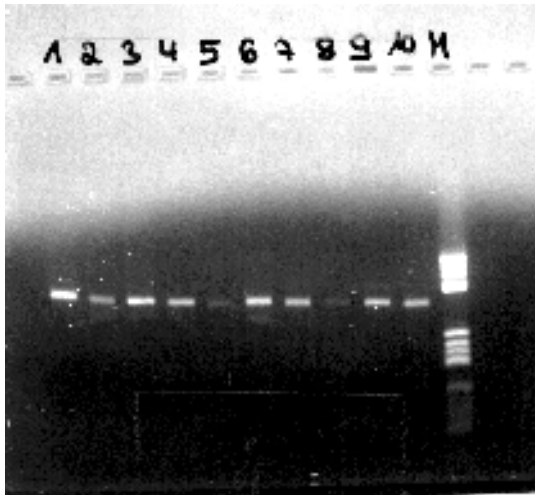


Abb. 21

Bei der Kontrolle der DNA-Reinigung kann durch Vergleich des DNA-Längenstandards (rechts) mit den Banden der bearbeiteten Proben auf die Konzentration der DNA-Fragmente geschlossen werden.

3.1.4. Sequenzreaktion

Zur Sequenzreaktion wurden 40ng *DNA* jeweils mit 8µl *Sequenzmix* (Taq dye sequencing kit) und mit 1µl eines *Primers* für den vorwärts replizierten Strang (ES 7) oder für den komplementären Strang (ED 33) versetzt. In 25 Zyklen à 10 Sekunden bei 96°C, 5 Sekunden bei 50°C und 4 Minuten bei 60°C wurden die Genomabschnitte mit farbstoffmarkierten Terminatoren versetzt, welche die sich verlängernde DNA-Kette gleichzeitig nach jedem Nukleotid beendeten. Später hinterließen die bei einer Gel-elektrophorese verschiedenen emittierten Lichtquanten ein charakteristisches Fluoreszenz-

muster, welches Rückschlüsse auf die Nukleotidreihenfolge erlaubte (Abbildung 22). Zuvor jedoch musste die DNA durch Ethanol fällung von sämtlichen Chemikalien bisheriger Reaktionsschritte gereinigt werden. 20µl *Sequenzansatz* wurden mit 50µl *Ethanol 95%* und 2µl *NaAcetat 3M* gemischt, 10 Minuten in Eis gekühlt, 30 Minuten zentrifugiert und vom Überstand befreit. Mit 250µl *Ethanol 70%* wurden die Proben nochmals 10 Minuten zentrifugiert und wiederum wurde der Überstand entfernt. Nachdem die Proben getrocknet waren, konnten sie der automatischen Sequenzierung (ABI Prism DNA-Analyse-System 337; Applied Biosystem, Foster City, CA) zugeführt werden. Die Daten wurden im Computerprogramm „Sequence Navigator“ von Applied Biosystems editiert. Phylogenetische Analysen wurden anschließend mit dem Programm Treecon 1.2 [224] durchgeführt. Die dadurch gestalteten Klassen von Subtypen wurden im weiteren Verlauf als Genotypen festgelegt.

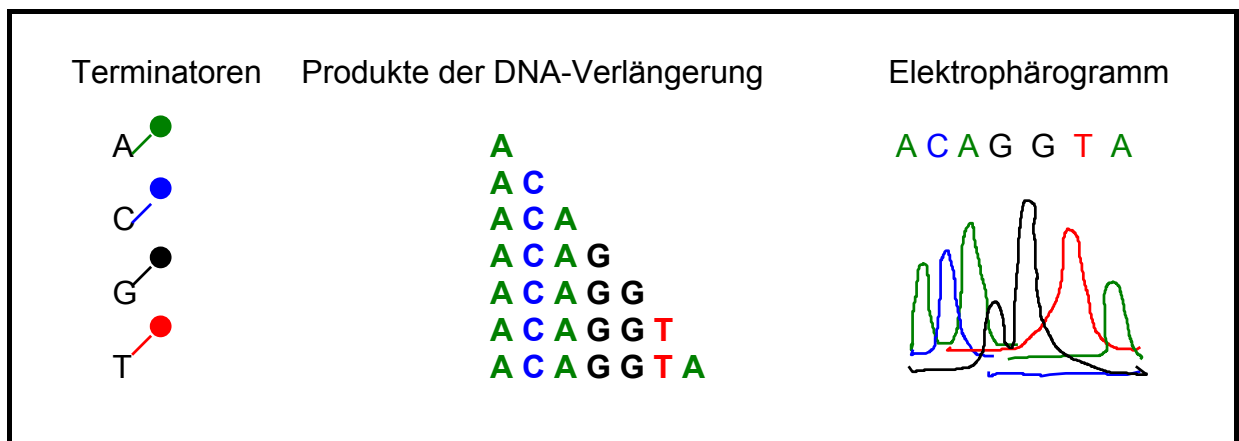


Abb. 22

Durch Farbstoff-gekoppelte Terminatoren wird die Nukleotidabfolge der DNA aufgeschlüsselt. Als Ergebnis erhält man zunächst ein Elektrophärogramm, in welchem Adenin als grüne, Cytosin als blaue, Guanin als schwarze und Thymin als rote Ausschläge dargestellt werden.

3.2. Heteroduplex Mobility Assay

Der erst 1993 beschriebenen Methode [48] des Heteroduplex Mobility Assay (HMA) zur Entdeckung der genetischen Virenviefalt und der Abschätzung der Divergenz verschiedener HIV-Stränge liegt das unterschiedliche Wanderungsverhalten experimentell erzeugten DNA-Kombinationen in der Gelelektrophorese zu Grunde.

Ausgangsmaterial für den HMA sind die Produkte der ersten PCR-Runde. Es folgte eine zweite PCR analog dem unter 2.1.2. beschriebenen Schema, lediglich das innere Primerpaar wurde durch ein anderes ersetzt: für die jetzt benötigten 1,2 Kilobasen langen DNA-Teilstücke sollten die Primer *ED 5* (5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG) und *ED 12* (5'-AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG) die Amplifizierung der V1-V5-umfassenden Region von gp120 ermöglichen.

5µl der so entstandenen „unbekannten“ *Patienten-DNA* wurden mit 5µl eines „bekannten“ *Standard-PCR-Produkts* (gemäß dem Heteroduplex Mobility Analysis HIV-1 env Subtyping Kit [47]) und 1,33µl *Annealing-Puffer* (1M NaCl, 100mM Tris-Cl / pH 7,8, 20mM EDTA) gemischt. Bis zu 8 verschiedener Standard-Subtypen konnten in einem Versuch jeweils mit Patienten-DNA kombiniert werden. Das Gemisch wurde 4 Minuten bei 94°C inkubiert, um die nativen DNA-Stränge zu trennen. Sofort im Anschluß erfolgte eine Kühlung in Eis (für 5 Minuten), wodurch sich heterogene Doppelstränge ausbildeten (Patient + Referenz). Ficoll-Orange oder Bromphenolblau konnten als Farbstoff-Marker zusammen mit den DNA-Gemischen auf ein vertikales 5% *Polyacrylamidgel* (5,6ml 40% Acrylamid-Lösung von BioRad, 3ml 2% Bisacrylamid-Lösung von BioRad, 9ml 5-fach TBE-Puffer, 27ml Aqua dest., 450µl frisch präparierte 10% Ammoniumpersulfat-Lösung und 36µl TEMED) geladen werden. Für die Tanks des Elektrophoresesystems wurde 1-fach TBE-Puffer benötigt. Als günstigste Laufzeit für das Gel erwies sich im Zuge der Untersuchungen 6 Stunden bei 210 Volt. Abschließend musste das Gel 5 Minuten in Ethidiumbromid-Wasser-Lösung getränkt werden, wonach es dann unter UV-Licht beurteilt werden konnte (Abbildung 23).

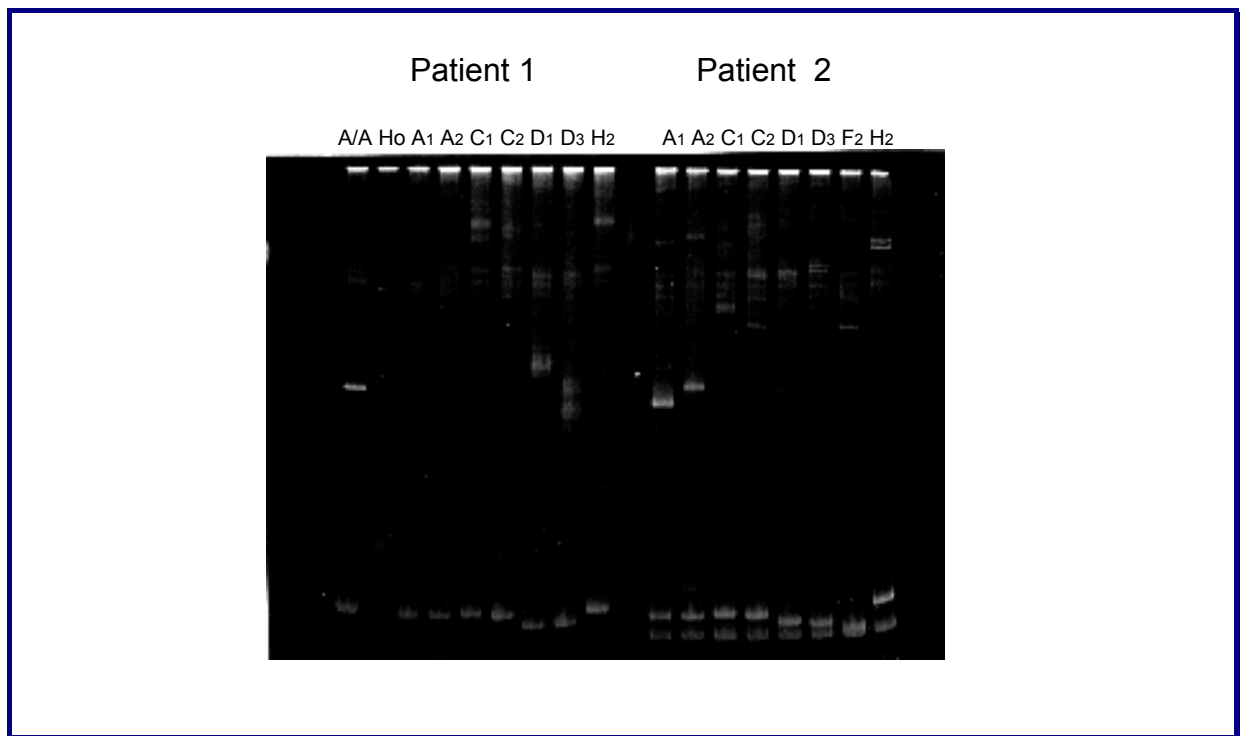


Abb. 23

Ethidiumbromid-gefärbtes Polyacrylamidgel nach abgeschlossenem HMA. Bearbeitet wurden 2 verschiedene Patientenproben. In der linken Spur lief ein Gemisch aus 2 verschiedenen HIV-A-Subtypen und dient somit als Referenz für einen Heteroduplex („Positivkontrolle“). Rechts davon wanderte Patienten-DNA ohne weitere Zusätze als „Homoduplex“ durch das Gel und konnte gleichermaßen als „Negativkontrolle“ dienen. In den 7 sich anschließenden Spuren war das PCR-Produkt eines Patienten mit jeweils unterschiedlichen Standard-Subtypen kombiniert. Auf der rechten Bildhälfte lief in 8 Spuren das Gemisch aus je einem bekannten Subtyp und den PCR-Amplifikaten eines zweiten Patienten. Anhand der markant hervorstechenden Banden auf Höhe der Positivkontrolle kann der Subtyp, der dem Patientenmaterial am ähnlichsten ist, leicht identifiziert werden (Patient 1= Subtyp D; Patient 2 = Subtyp A).

3.3. Peptid-gestützte Subtypisierung durch serologische Analyse von V3-Antikörpern

Das Plasma der 90 Patienten war mit Enzygnost 1 / 2 plus von Behring (Marburg) auf anti-HIV getestet worden. Danach wurden vier - in unterschiedlichen Laboratorien entwickelte - ELISAs für die serologische Testung herangezogen. Drei davon nutzten die Peptid-gestützte indirekte EIA-Methode: synthetische Peptide, die auf Mikrotiterplatten geschichtet wurden, binden ihre spezifischen, V3-loop-gerichteten Antikörper aus dem Patientenserum. Dieser Komplex wiederum wird von einem Enzym-bestücktem anti-Human-Antikörper gebunden. Die Reaktion wird durch die enzymbedingte Farbreaktion eines Substrats sichtbar. Der vierte Test basiert auf der Blockierung der Antikörperbindung durch einen Überschuss von Peptiden in der flüssigen Testphase.

Die Peptide aller vier ELISAs für die Subtypen A bis E sind relativ ähnlich und variieren vor allem in ihrer Länge, wie Abbildung 24 zeigt.

A	BEH		- - - R K S I H I G P G Q A F Y A T
A	ICSM		- - - - K S V H I G P G Q A F Y A T
A	GSH		- - - - K S V H I G P G Q A F Y A T
A	UFR		N N T R K S V H I G P G Q A F Y A T G DIIGDIRQAHC
B	BEH		- - - R K R I H I G P G R A F H Y T G R
B	ICSM		- - - - K S I H I G P G R A F Y T T
B	GSH	CTRPNN	N T R K S I H I G P G R A F Y T T G EIIGDIRQAHC
B	UFR		N N T R K S I H I G P G R A F Y T T G EIIGDIRQAHC
C	BEH		- - - R K S I R I G P G Q T F Y A T G D
C	ICSM		- - - - K S I R I G P G Q T F Y T T
C	GSH		- - - - K S I R I G P G Q T F Y T T
C	UFR		N N T R K S I R I G P G Q T F Y A T G DIIGDIRQAHC
D	BEH		- - - R Q R T H I G L G Q A L Y T T
D	ICSM		- - - R Q R T H I G P G Q A L Y T T
D	GSH		- - - R Q R T H I G P G Q A L Y T T
D	UFR		N N T R Q R T H I G P G Q A L Y T T - RIIGDIRQAHC
E	BEH		- - - R T S I T I G P G Q V F Y R T
E	ICSM		- - - D T S I T I G P G Q V F Y R T
E	GSH		- - - D T S I T I G P G Q V F Y R T
E2	GSH	CTRPSN	N T R T S I T I G P G Q V F Y R T G DIIGDIRKAYC
E	UFR		N N T R T S I T I G P G Q V F Y R T G DIIGDIRQAHC

Abb. 24

3.3.1. ELISA von Behring, Marburg und dem Pettenkofer-Institut, München (BEH)

Für diesen indirekten ELISA wurden die Serumproben 1:25 mit anti-HIV-negativem Serum verdünnt. Als Konjugat diente mit Peroxidase versehenes anti-Human-IgG, als Substrat Tetramethylbenzidin. Die Peptide dieses Tests für Subtyp A bis E waren bis zu 20 Aminosäuren lang. Zur Kontrolle enthielt der Test das Gnann-Peptid aus gp41 eines HIV-1 Subtyps B, das gp41 ohne Cysteinreste und gp41 des Gruppe O-Virus MVP-5180.

Nach zweimaligem Waschen der Testplatten wurden je Schacht zu 50µl Puffer 50µl verdünntes Patientenserum pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Es schlossen sich 5 Waschvorgänge an. Danach wurden 100µl Konjugat zugegeben und wiederum für 30

Minuten inkubiert. Nach dem Waschen wiederholte sich dieser Schritt mit 100µl Substrat und Inkubation bei Raumtemperatur. Nach dem Stoppen der Reaktion konnte das Ergebnis bei 450nm innerhalb einer Stunde abgelesen werden. Das Peptid, das nach der Reaktion mit dem Patientenserum bei der Messung der optischen Dichte zu den höchsten Werten führte, wurde als Subtyp festgelegt.

3.3.2. ELISA des Imperial College at St. Mary's Hospital, London (ICSM)

Bei diesem von Cheingsong-Popov et al. [32] beschriebenen und im Rahmen des WHO Network on Virus Isolation and Characterization entwickelten indirekten ELISA können durch ein zweizeitiges Verfahren die sich ergebenden Kreuzreaktionen nochmals analysiert werden. Es wurden Peptide der Länge von 14 und 15 Aminosäuren (in 20mM Carbonatpuffer, pH9,6) in einer Konzentration von 10µg/ml auf die Testplatten aufgebracht. Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Platten gewaschen und für zwei Stunden mit Puffer (PBS, pH 7,4) geblockt. Nach einem nochmaligem Waschgang waren die Testplatten bereit. Die Patientenseren wurden 1:100 verdünnt und mit den Peptiden A bis E für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschvorgang konnte die Antikörperbindung an die Peptide mit Hilfe einer anti-Human-IgG-Peroxidase als Konjugat, welches 1 Stunde bei 37°C auf der Platte belassen wurde, in einer Farbreaktion bei 492nm photometrisch nachgewiesen werden. Zur Kontrolle dienten in jedem Lauf HIV-negative Proben. Der Subtyp wurde wiederum durch die höchste optische Dichte bestimmt.

Erhielt man bei einem Patientenserum mehrere gleichhohe Werte, wurden die Peptide mit einem Antigen-eingrenzenden ELISA weiterbearbeitet. Dabei wurden V3-Peptide in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 1, 0,1 und 0,01µg/ml in 20mM Carbonatpuffer) auf eine Testplatte aufgebracht. Ansonsten läuft der ELISA wieder wie oben beschrieben ab. Der serologische Subtyp entsprach dann schließlich dem Peptid, das bei der geringsten Konzentration die höchste Antikörper-Bindungsrate aufweisen konnte.

3.3.3. ELISA des Georg-Speyer-Hauses, Frankfurt (GSH)

Für die Subtypen A, C, D und E nutzt dieser Test die gleichen Peptide wie der ELISA des Imperial College at St. Mary's Hospital. Zusätzlich werden hier aber bei den Subtypen B und E auch komplette cyclische V3-loop Peptide verwendet [70]. Die Testplatten wurden pro Fach mit 500ng der Peptide, gelöst in 100µl eines 0,5M Bicarbonatpuffers (pH 9,8), beschichtet. 100µl 1:500 verdünntes Plasma wurde gegen alle 6 Peptide getestet. Zum Antikörpernachweis diente anti-Human-IgG der Ziege als Konjugat und Phenylendiamin als Substrat. Die Reaktion wurde mit 100µl 1M H₂SO₄ gestoppt; anschließend wurde der Wert der optischen Dichte bei 492nm gemessen. Der serologische Subtyp berücksichtigte sowohl das gesamte Aktivitätsmuster aller Peptide als auch die stärkste Einzelreaktivität und spezifische Kreuzreaktionen.

3.3.4. ELISA der Université François Rabelais, Tours Cedex (UFR)

Der von Barin et al. [12] beschriebene Test soll durch sein etwas abweichendes Verfahren einen großen Teil der Kreuzreaktionen, die normalerweise bei indirekten ELISAs beobachtet werden, vermeiden können. Die Peptide für diesen Test bestanden aus Teilen der Länge von 29 oder 30 Aminosäuren. Die einzelnen Schächte der Mikrotiterplatten wurden mit je 0,5 µg/ml der sythetischen Peptiden aller 5 Subtypen (A bis E) beschichtet. Pro Patient wurden jeweils 25µg eines in 10µl Puffer gelösten Peptids (A, B, C, D *oder* E) in die Testgefäße 1 bis 5 gegeben. 10µl einer 250µg/ml-Lösung aus einer äquimolaren Mischung aller fünf Peptide (A, B, C, D *und* E) wurden in einen sechsten Schacht gegeben, was theoretisch einer 100%igen Blockierung gleichkam. In einen siebten Schacht wurden nur 10 µl Puffer zugegeben; dies bedeutete 0% Blockierung. 100µl 1:100 verdünntes Patientenserum wurde in die Reaktionsgefäße 1 bis 5 zugegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur eine halbe Stunde lang inkubiert. Es schlossen sich die üblichen Waschvorgänge und die Zugabe von Konjugat und Substrat wie auch bei indirekten ELISAs an. Mindestens 50% Unterschied in der optischen Dichte zwischen blockierter Kontrolle und Kontrolle ohne Peptide ermöglichte eine Validierung des Tests. Der Subtyp entsprach dem Peptid, das die stärkste Blockierungsreaktion und damit die geringste optische Dichte hervorbrachte.

3.4. Qualitätssicherung der Untersuchungen

Sowohl bei den serologischen Tests als auch bei den direkten DNA-Nachweisverfahren wurde im Rahmen jeder Untersuchung eine „Negativkontrolle“ ohne Patientenserum oder DNA zur Qualitätssicherung mitbearbeitet. Gerade die gegenüber Verunreinigungen mit Fremd-DNA hochempfindlichen Reaktionsschritte der PCR wurden durch die im Arbeitsablauf integrierten Gelelektrophoresen mehrfach auf Kontaminationen kontrolliert.

Einzelne Proben wurden ein zweites Mal bearbeitet um darzustellen, dass das Ergebnis wiederholbar und nachvollziehbar ist.

3.5. Computer-Software

Die Korrelation der einzelnen Ergebnisse aller ELISAs mit dem Genotyp wurde mit SPSS (Statistical Package Software for the Social Sciences; SPSS, Chicago, IL) analysiert. Mit BETATURN (PC/GENE, IntelliGenetics, Mountain View, CA) wurden die Eigenschaften der V3-loop Sequenz gemäß des Chou-Fasman-Algorithmus bestimmt [35]. TREECON wurde zur phylogenetischen Analyse herangezogen [224].

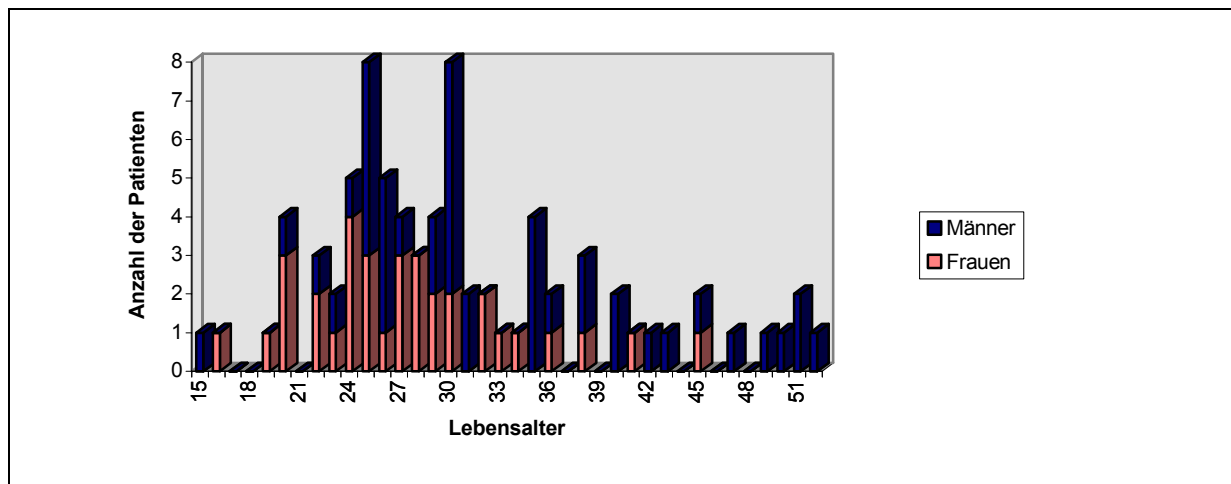
IV Ergebnisse

1. Probandendaten

Im Jahr 1996 wurde Patienten des Mbeya Referral Hospital, Tanzania, die mindestens zwei CDC-Kriterien für die Diagnose AIDS erfüllten, jeweils 30 ml Blut abgenommen. Von initial 113 untersuchten Patienten erwiesen sich in einem, in Tansania durchgeführten HIV-ELISA (Enzynost 12plus) 90 als HIV-positiv. Von diesen Patienten wurden PBMC und Plasma isoliert und in flüssigem Stickstoff nach Deutschland transportiert. Diese 90 Proben waren Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Von den Patienten, deren Probenmaterial hierbei untersucht wurde, waren Angaben zur Person und zur bestehenden Krankheits-symptomatik erhoben worden. So erlaubt die Kenntnis der Geschlechterzugehörigkeit die Trennung der Patienten in 37 Frauen (43.5%) und 48 Männer (56.5%). Bei fünf Patienten stehen keine Angaben zur Verfügung.

Hinsichtlich der Altersverteilung lag der mittlere Wert der infizierten Frauen bei 27.5 Jahren, das Durchschnittsalter der Männer bei 34 Jahren.

Tabelle1: Altersverteilung der Patienten

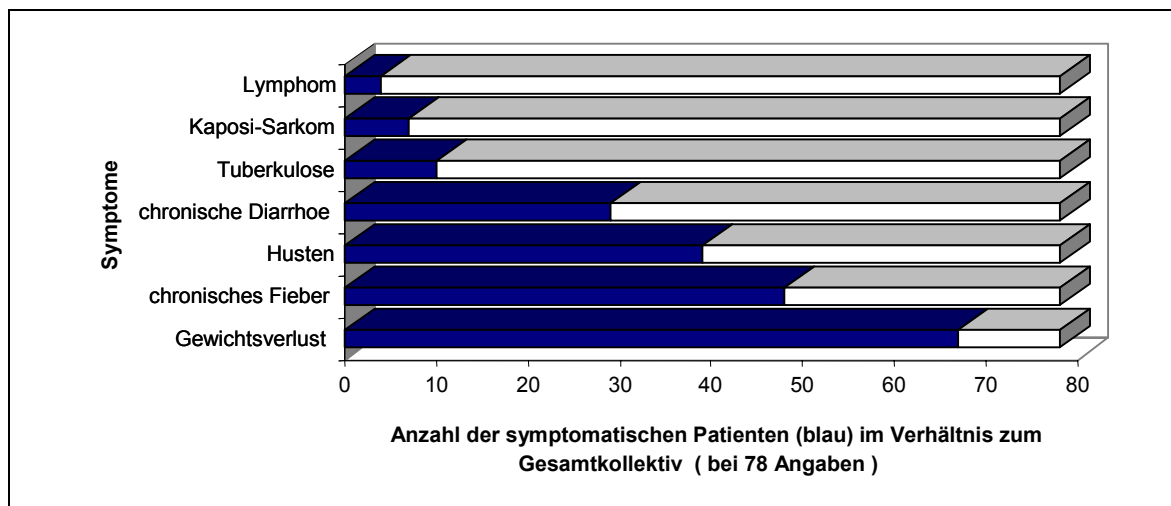


Von 74 Patienten (82%) lagen Angaben zur Herkunft vor. Bei der Einteilung in städtische und ländliche Bevölkerung bietet sich die Trennung der Menschen, die aus der Stadt Mbeya direkt stammen, und derer, die aus den umliegenden Bezirken kommen, welche aufgrund

ihrer geringen Bevölkerungsdichte (zwischen 10 und 150 Einwohner pro Quadratkilometer) im folgenden als ländliche Regionen eingestuft werden. Sogesehen läßt sich das Patientenkollektiv jeweils zur Hälfte in Stadt- und Landbevölkerung aufteilen.

Keiner der 78 Patienten, über die persönliche Angaben zum Krankheitsstadium vorhanden sind (87%), war völlig ohne Krankheitszeichen. Standardmäßig erfaßt wurden klassische Symptome, die den Progress von AIDS dokumentieren. Bei den zusätzlich angegebenen Beschwerden dominierten Neuralgien und durch Mykosen verursachte Läsionen von Haut und Schleimhäuten.

Tabelle 2: Erfassung von Krankheitszeichen der Patienten



2. Genotypisierung mittels PCR und Sequenzierung

Bei 86 von 90 Proben (95.5%) gelang eine ausreichend starke PCR-Amplifizierung, um auch nach der Aufreinigung genügend genetisches Material für die Sequenzierung zu haben. Dabei wurden 62 Proben (72%) im ersten Anlauf erfolgreich bearbeitet, während in 5 Fällen eine dritte Amplifikationsrunde nötig war, ehe das Material der Sequenzierung zugeführt werden konnte (5.8%).

Abb. 25: Aminosäuresequenzen der 86 Proben, die nach der PCR ausreichend DNA zur weiteren Analyse zeigten, im Vergleich mit Konsensussequenzen des jeweiligen Subtyps.

Consensus A LLLNGSLAEIII-VMIRSENITNNAKTIIVQLVKP--VKINCTRP--NNNT.RKSVRI..GPGQ..AFYAT...GDIIG.DIRQAHCNVSRTAWNKTLLQVATQLRK...YF..NKT...IIFA..NSSGGDLEIT
 mb6567-a1 -----RSENITNNAKTIIVQFVNP--VNITCIRP--NNNT--RRSVRI--GPGQ--TFYAS---DIIIG-DIRQAYCTVNRTAWNNTVQKVATQLRK---YFV-NKT---IIFT--RSSGGDLEIT
 mb6631-a3 -----AEEK-VMIRSENITNNAKNLLVQLTEP--VQINCTRP--NNNT-RKGVHI--GPGQ--AFYAT---GEIIG-NIRQAHCNVSRTAWNNTLKRVTQLRE---YFG-NKT---IIFA--SPSGDLE--
 mb6657-a1 MLLNGSLAEIII-VRIRSENITNNAKNIIVQFDEP--VKINCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6678-a1 LLLNGSLAEIII-IRIRSENITNNAKTIIVQFAKP--VQINCTRP--NNNT--RVGIGI--GPGK--MFYAN---NIIG-NIRQAYCNVSRDWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6703-a1 --LNGSLAEGGKVMIRSENITNNAKNIIVQLTKP--VTINCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSREEWNTLREVVQLRT---YFG-NKT---IMFN--NSSGGDLEIT
 mb6737-a1 --LLNGSLAEIII-VRIRSENITNNAKNIIVQFTEP--VQINCTRP--NNNT--RRRIRI--GPGQ--AFIAT---NAIVG-DVRKAHCNISRRTAWNNTLQKVVKQLRT---HW--NTT---IVFT--KSSGGDLEIT
 mb6738-a1 --LFNGSLAEIII-VMIRSENITNNAKNIIVQLTEP--VRINCTRP--NNNT--RRSVRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRSAWNNTLQVAVQLGK---YF--NKT---IIFA--NSLGGDLEIT
 mb6746-a3 LLLNGSLAEGKVMIRSENITNNAKNIIVQFYKP--VTINCTRS--YNNT--RRGLRI--GPGQ--AFFAM---GAVTG-NIR--HCNVKAEWDEAMNETIMQLRT---YFK-NKT---IIFD--KPSGGDPK--
 mb6771-a1 LLLNGSLAEIII-VIIRSENITNNAKNIIVQLTTP--VRINCTRP--NNNT--RTSIRI--GPGQ--TFYAT---DIIIG-DIQAHCNVSRTAWNNTLQVAVQLRT---HF--NKT---IL-----
 mb6774-a1 ----GSLSEEEI-IVIRSENITNNAKNIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--IRKSMRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-NIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLGK---HF--NNN---TIIFT--NSSGGDLEI-
 mb6791-a3 LLLNGSLAEIII-VMIRSENITNNAKNIIVQFTEA--VKINCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--SFIAT---GAIIG-DIRQAHCNVSRTAWNNTLQVAVQLRR---YFGDNKT-----
 mb6831-a3 LLLNGSLAEIII-VKIRSENITNNAKNIIVQLKDP--VKINCTRP--NNNT-RKSVHI--GPGQ--AFYAT---GEITG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRA---HFG-NKT---I-----
 mb6837-a1 -----ESDENITNNAKNIIVQFDKP--VKINCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLGK---HF--NKT---IIFT--NSSGGDLEIT
 mb6839-a1 -----RE-IRIRSENITNNAKTIIVQLVTP--VQINCTRP--NNNT--RESIRI--GPGQ--AFYAT---DIIIG-NIRQAHCNVSRTAWNNTLHHVARQLRT---YF--NKT---IIFT--ESSGGDLEIT
 mb6847-a1 LLLNGSLAEIII-VMIRSENITNNAKNIIVQFTSP--VQINCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRTAWNNTLQVAVQLRT---YFR-NKT---INFD--TSSGGDPN--
 mb6874-a2 ----CNGSLAEIII-IRIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--IRKSMRI--GPGQ--TFYAS---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---YFG-NKT---IIFT--NSSGGDPEIT
 mb6937-a1 ----GSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVQLAKP--VKINCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--ASFAT---DIIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---YFR-DKT---IIFA--NSSGGDLE--
 mb6938-a1 --LLNGSLAEGK-IMIRSENITNNAKNIIVQLNKP--VQINCTRP--NNNT-RKGVSI--GPGQ--AFYAT---DIIIE-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRP---YFR-NKT---IIFA--KSTGGDLEIT
 mb6979-a3 --LLNGSLAEGK-MIIRSENITNNAKNLLVQLTAP--VNITCIRP--NNNT--IRKSMRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---HFG-NNT---IIFA--SSSGDPK--
 mb6981-a1 --LLNGSLAEGE-IIIRSGNITNNAKNIIVQLAKP--VIINCTRP--NNNT--RRSVHI--GPGQ--AFYAT---GEIIG-NIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRR---HFN-NKT---IIFE--NSTGGDLEIT
 mb6984-a1 ----NGSLAEIII-VMIRSENITNNAKNIIVQFTEP--VKINCTRP--NNNT-RKSVHI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---YFE-NKT---IIFA--NSTGGDLEIT
 mb7032-a1 --LLNGSLAEGE-VKIRSENITNNAKTIIVQLNKS--VEIVCTRP--NNNT-RKSVHI--GPGQ--AFYAT---DIIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRE---HFN-NKT---IIFN--PSSGGDLEIT
 mb7035-a3 ----SLAEIII-VMIRSENITNNAKNIIVQLNKP--VQINCTRP--NNNT--RTSTRY--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRE---HFG-NKT---IIFT--KPQGGDPNY
 mb9005-a1 -----RSENITNNAKNIIVQLTKP--VKINCTRP--NNNT--RTSIRI--GPGQ--TFYAS---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---YFN-NKT---IIFT--LSSGGDLEIT
 mb9008-a1 LLLNGSLAEGK-VMIRSENITNNAKNIIVQLTEP--VQINCTRP--NNNT--RTSIRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRT---YFW-NKT---IIFA--NPTGENLEIT

Consensus C LLLNGSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS..VEIVCTRP..NNNT.RKSVRI..GPGQ..TFYAT...GDIIG.DIRQAHCNISKDKWNETLQVAVQLRAE...HFP.NKT...IKFA..PSSGGDLEIT
 mb6536-c --LLNGSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLKDP--VGINCIRP--NNNT--RESIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISKDKWNETLQVAVQLRAE---HFP-NKT---IIFA--PSSGGDLEIT
 mb6564-c LLLNGSLAEGE-IRIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6568-c --LLNGSLAEGE-MIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6576-c ----NGSLAEIII-IVIRSEDMTNSAKTIIVHLNKS--VEIECTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---GGIIG-NIRQAHCNISRRTAWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6582-c LLLNGSLAEGE-IIIRSVNLTDNAKTIIVHLNKS--VEIMCIRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6583-c -----KNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RRSMRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISRRTAWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6584-c FLLNGSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEINCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISRRTAWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6663-c ----GSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6666-c ----NGSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6734-c --LLNGSLAKGE-IIIRSENITNNAKTIIVQLKEP--VEIVCTRP--NNNT-RKSMRIGIRGQ--TFYAT---GKVIIG-NIRQAHCNISRRTAWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6736-c --LLNGSLAEIII-TIIRSENITNNAKTIIVQLKDP--VKINCTRP--NNNT--RESIRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-NIRQAYCTVNRTAWNNTVQKVATQLRK---YFV-NKT---IIFT--RSSGGDLEIT
 mb6777-c ----AEEE-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6789-c LLLNGSLAEIII-IIIRSEDLRDNKTIIVHLDES--VEIDCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6790-c ----NGSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIMCIRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6792-c LLLNGSLAKE--IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6793-c ----GSLAEGE-IIIRSEDLTNNAKTIIVHLNKS--VEINCTRP--NNNT-RKGVHI--GPGQ--AFYAT---GEITG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRA---HFG-NKT---I-----
 mb6832-c LLLNGSLAEIII-VKIRSENITNNAKNIIVQLKDP--VKINCTRP--NNNT-RKSVHI--GPGQ--AFYAT---GEITG-DIRQAHCNVSRAEWNTLQVAVQLRA---HFG-NKT---I-----
 mb6834-c LLLNGSLAEGE-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6835-c ----GSLAEIII-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6848-c -----EGE-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIECTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT
 mb6876-c -----IRSANLSDNVKTIIVHLNKP--VTINCTRP--NNNT--RRSVRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-NIRQAHCNISRRTAWNNTLQVAVQLGK---HFK-NKT---I-KLL-----
 mb6884-c ----GSLAEGE-IIIRSENITNNAKTIIVHLNKS--VEIVCTRP--NNNT--RKRKTHI--GPGQ--SFIATRT--DSGTG-NIRKASCNVNGTEWNETLKRVTQLRE---YF--NTT---TIIFN--PSSGGDLEIT

mb6959-c ---NGRLAEGD-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--IEINCTRP--NNNT-RQSIRI--GPGQ--AFCAT---GEIIG-DIRQAHCNISEYTWNKTLQNVRRKLE---HFP-NKT---IAFK--PSSGGDLEIV
mb6960-c -----KE-NNIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VQINCTRP--GNNT-RKSIRI--GPGQ--VFYAN---N-IIG-DIRQAYCNISGKRWNETLQRVVEKQLD---HFP-DKT---IKFA--PHSGGDLKIT
mb6977-c ----GSLAEGE-IIRSENLTDNAKTIIIVHLNES--VKINCTRP--SNNT-RKSGI--GPGQ--AFFAT---GDIIG-DIRQAHCNISRTKWNKTLERVSEKLLK---HFP-NKT---IIFQPQSSGGD---
mb6978-c ----NGSLAEGE-IIRSENLTDNAKTIIIVHLNES--VEINCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--AFYAT---DIIG-DIRQAYCNISEAKWNQTLQRVSKLEE---YFP-DKP---IGFE--PSSGGDLEIT
mb6982-c ----GSLAEGD-IIRSENLTNTKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--GNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GEIIG-DIRQAHCNITKGNWNRTLQMVGKLEE---HFP-NKT---ITFQ--PSSGGDLEIT
mb6983-c -----G-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEITCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---GEIIG-DIRQAHCNISDEKWNKTLQRVVEKLLK---YFP-NKT---IEFK--PSSGGDLEIT
mb7033-c -----AEGE-MIIRSENLTDNAKTIIIVHLNES--VQIVCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--AFFAY---NGIIG-DIREAHCNISKGAWNETLQRVGKRLK---LFP-EKT---ITFE--SSSGDLE--
mb7034-c -LVNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIMCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYA---NDIIG-DIRQAYCNVSEREWTRTLQKVGKLLAE---HFP-NKT---IRFN--HSSGGDLEIT
mb7036-c ---NGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIKVCRP--NNNT-RKSMRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISERKWNKTLQRVGKLLQ---HFP-NKT---IKFE--P-----
mb7051-c LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---NDIIG-DIRQAHCNISKDRWSRTLQKVGKLLSE---HFP-NKN---MTFN--HSSGGD---
mb7052-c -----IIRSENLTQAGTIIIVHLNES--VEICTRP--NYNT-RRRIRI--GPRG--AFYTT---GAIIG-NIRQARCNISEGKWNKILQEVGKTLAK---HFP-NKI---IKFT--QHSGGDPEIT
mb7054-c -LVNGSLAEEED-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIECTRP--NNNT-RRGIGI--GPRG--TFYTT---GAIIG-DIRQAHCNISEGKWNKILQGVGKTLAK---HFP-NKT---IKFT--QHSGGDPELT
mb7055-c PLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEITCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---DIIG-DIRQAHCNISEMKNWNETLQDVGKELAK---RFP-NKT---IKFT--RSSGG-----
mb9001-c ----NGSIAGTE-IIRSENLTDNAKTIIIVHLNES--VEITCTRP--GNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAYCNISETKWNKTLQRVSGKLE---HFP-NRN---ISFA--P-----
mb9002-c ----LARRQ-IIRSENLTNNVKTIIIVHLKTP--VEINCTRP--NNNT-RKSMRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNIRTTTAWNQTLREVSEELAE---HFP-NKT---IEFA--PHSGGDIEIT
mb9004-c ----SLAEGE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEITCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAYCNISGEQWNRTLQRVVEKLLK---HFP-NKT---IQFD--QPSGGDLEIT
mb9006-c LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--GNNT-RKSMRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISEDNWNETLQGVSRKLE---HFP-NST---RIRFA--PSSGGDLEIT
mb9008-c LLLNGSLAESK-VMIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VQINCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--AFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISEAAWNETLQEVANQLRT---YFW-NKT---IIFA--NPTGENLEIT
mb9009-c LLLNGSLAEGE-IIRSENLTDSVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--NNNT-RKSVRI--GPGQ--TIYAT---GDIIG-NIRQAHCNITKDWNETLQGVREKLEK---HYH-RD---IKFV--PPAGDLEIT
mb9010-c LLLNGSLAEGE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--GNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAYCNINRTTWNKTLQKVGKLE---HFN-KTT-----
mb9011-c LLLNGSLAEKE-IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--NNNT-RKSTRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISEAWNETLQKVGKLLQ---HFP-NKT---MRFA--PSSGGD---
mb9012-c -----IIRSENLTNNVKTIIIVHLNES--VEIECTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--AFYAT---NEIIG-DIRQAHCNISEKDWNETLQVVRKFK---LFP-NKT---IKFN--QYLRGFRNC
mb9013-c LSVNGSLAEEED-IIRSENLTNSIKTIIIVHLNES--VEICTRP--SNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIREAHCNISEGWNKTLQRVVKKLE---RFP-NKI---IKFA--PHAGDLEIT
mb9014-c ---YGLAEEE-IIRSGNLTNNVKTIIIVHLNES--VEIVCTRP--GNNT-RKSVRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAYCNINSEAWNETLQKVVKKLQ---HFP-NKN---IKFE--PSSGGDLEIT
mb9015-c -----SLAKE--IVIRSENLTNTKTIIIVQLNET--VQINCTRP--NNNT-RESIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISREAWNKTLQVVIDKLLQ---HLP-NKT---IDFR--NHSGGDLEIT

Consensus D LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLNES..VTINCTRP..YNNR.RQRTSI..GPGQ..ALYTT...RIIG.DIRQAHCNISGAEWNETLQQVAKKLG...LL..NKT...TIIFK..PSSGGDPEIT
mb 2975-d3 ---GSLAEGG-IVIRSENLTNNVKTIIIVQLNQS--VTINCTRP--YQNR-RQRTSI--GQGG--SLYTM-RGTEKSG-WTQAHCVNSGTEWNNTLQQVAKPLRD---LL--NTT---EIIIFE--PFLGGDPEIT
mb 6675-d1 ---YGLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLKEP--MTITCVRP--YNNR-RQRTSI--GQGG--SLYTM-RGTEKSG-WTQAHCVNSGTEWNNTLQQVAKPLRD---LL--NTT---EIIIFE--PFLGGDPEIT
mb 6806-d1 LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLNET--VNIICARP--YNNR-RRGVHI--GPGQ--AYYTT---NIVG-DIRQAPCNISGAAWNKTLLQVATTLGD---LL--NKT---TILFR--PSSGGEATSG
mb 6836-d3 LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLNES--VAITCARP--YKTR-RKYTYMGLKGG--AYYTT---QIEG-NIKRAYCNISEAGWNKTLQQVVKKLRD---LL--NIT---TIIFK--PSSGGTPE--
mb 6853-d2 --CNGSLAEEKE-IVIRSENLTNNVKTIIIVQLNES--VTINCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISGTGWNKTLQQVAKKLG---LL--NQT-----
mb 6882-d1 LLLNGSLAEEE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLNES--VTINCTRP--NNNT-RQRTSI--GPGQ--TIWTT---SVIG-DIRQAYCNISGEGWNKTLQQVANKLGA---LL--NKT---TIDFR--PSSGGDPEIT
mb 6883-d1 ----GSLAEGE-IIRSGNLTNSKNIIVQLNES--VTINCTRP--YK--RKGINM--GSGE--AYYTS---KIIG-DIRKAHCTINGTEWNTLQQVAKKLR---LL--NIT---KIIIFN--SSSGRPRNP
mb 6950-d2 -----IIRSENLTNNVKTIIIVQLNDS--VTINCTRP--NNNT-RQRTSI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISGTEWNNTLQRVVAKKLRD---LL--NTT---TIIFK--PSSGGDPEIT
mb 6953-d2 -----INEY--SLKRSNLTNNVKTIIIVQLNES--VTINCTRP--NNNT-RKSIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIREAHCNISRTWNETLQQVATKLRD---LF--NQT---TIIFK--PSSGGDPRNY
mb 6954-d1 LLLNGSLAEEE-IIRSDNLTNNVKTIIIVQLNKS--VTINCTRP--NNNT-RQSIRI--GPGQ--TFYTT---KIIG-DIRKAHCNISGIEWNNTLQQVANKLRN---LL--NLT---TIIFK--PSSGGDPEIT
mb 6955-d1 -----RSENLTNNVKTIIIVQLNES--VAINCTRP--YNNR-RQSTHI--GPGQ--ALYST---EIIIG-DIRQAHCNISEAAWNETLQQVAKKLRD---LL--NKT---TINFK--PSSGGDPEIT
mb 6958-d1 ---NGSFAEGE-IIRSENLTNNVKTIIIVQLNKS--VNICTRP--NNNT-RKGIHI--GPGQ--AFFTT---ERIIG-DIRQAHCNISEIEWNNTLQQVAKKLG---LL--NKT---TIIFR--PSSGGDPEN--
mb 6961-d2 -----GGD-IVVGYENLTNNVKTIIIVQLNES--VTINCMRP--NNNT-RKGIRI--GPGQ--TFYAT---GDIIG-DIRQAHCNISGTWNNTLHQVATQLRD---LF--SCT---GNIITD--KIIIFRPH---

Consensus G LLLNGSLAEEE-IMIRSENFTDNAKTIIIVQLNKS..IEINCTRP..NNNT.RKSIFT..GPGQ..AFYAT...GDIIG.DIRQAHCVNSRTKWNKTLQVAKKLRK...IY..NKT...ITFN..SSAGGDLEIT
mb 6729-g -LVNGSLAEGE-VIIRSKNITDNAKTIIIVQLNKT--VAITCVRP--DNNT-RKSIPI--GPGQ--VIYAT---GEIIG-NIRQAHCNISKADWNTLNKVVAVKLRG---YF--NKT---INFT--SASSGDLEIM

Bei 14 Proben (16.3%) mußte eine zweite Versuchsreihe von neuem gestartet werden, da nach dem ersten abgeschlossenen Amplifizierungsversuch nur schwache Banden zu sehen waren. Das Probenmaterial von weiteren 5 Patienten (5.8%) mußte außerdem - wie in 3.1.2. beschrieben - mit anderen Primern (in 2 Fällen) bzw. auch mit einer anderen Polymerase (in 3 Fällen) bearbeitet werden, damit ausreichend Material für die Sequenzierung erhältlich wurde.

Die Nukleotid-Sequenz-Analyse des C2-C3-Abschnittes ergab für die 86 Proben die in Abbildung 25 gezeigten Aminosäure-Abfolgen, die hier im Vergleich zu je einer globalen Konsensus-Sequenz für den entsprechenden Subtyp [Myers1995] angeordnet sind. Die Verteilung ergab 25 Proben vom Genotyp A (29%), 47 vom Genotyp C (55%), 13 vom Genotyp D (15%) und 1 Probe, die dem Genotyp G entspricht (1%).

3. Genotypisierung mittels HMA

Der Heteroduplex Mobility Assay wurde an 22 (25,6%) zufällig ausgewählten Proben durchgeführt, wobei pro Lauf zwei Proben bearbeitet werden konnten. In 5 Fällen konnte keine DNA-Bande abgelesen werden, bei den übrigen 17 Patientenproben waren die Ergebnisse sehr deutlich abzugrenzen. 6 Proben wurden demnach als Subtyp A, 6 Proben als Subtyp C und 4 Proben als Subtyp D identifiziert (Abbildung 26). Hierbei ergab die Genotypisierung im Vergleich mit der DNA-Sequenzierung eine Konkordanz von 100%. Die Probe mb6839 wurde zufällig zweimal ausgewählt, wobei das Sequenzierungsergebnis (Subtyp A) beide Male mit dem HMA-Verfahren bestätigt werden konnte.

Subtyp A	Subtyp C	Subtyp D
mb6567	mb6777	mb2975
mb6737	mb7034	mb6883
mb6738	mb7036	mb6954
mb6771	mb7052	mb6955
mb6839 2x	mb9001	
mb6981	mb9010	

Abb.26: Ergebnis der HMA-Genotypisierung

4. Ergebnisse der serologischen Analysen

Über die Prävalenzen der serologischen Subtypen entsprechend den Ergebnissen der vier unterschiedlichen ELISAs gibt die Tabelle 3 einen Überblick.

Tabelle 3: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

HIV-1-Genotyp	A (n=25)	C (n=47)	D (n= 13)	G (n=1)
Ergebnisse der serologischen Tests				
BEH-ELISA n=86	A 12 48% B 1 C 9 D 1 E 1 <u>nb</u> 1 total 25	C 24 51% A 10 B 3 D 1 E 7° <u>nb</u> 2 total 47	D 4 31% A 3 B - C 5 E - <u>nb</u> 1 total 13	G 0 C 1 total 1
ICSM-ELISA n=83	A 10 42% B - C 11 D 2 E - <u>nb</u> 1 total 25	C 43 96% A - B - D - E - <u>nb</u> 2 total 45	D 2 17% A 3 B 2* C 3 E - <u>nb</u> 2 total 12	G 0 C 1 total 1
GSH-ELISA n=83	A 10 40% B - C 15 D - E - <u>nb</u> - total 25	C 40 91% A 1 B - D 1 E 1° <u>nb</u> 1 total 44	D 4 31% A 2 B - C 6 E - <u>nb</u> 1 total 13	G 0 C 1 total 1
UFR-ELISA n=84	A 11 44% B - C 14 D - E - <u>nb</u> - total 25	C 43 96% A 2 B - D - E - <u>nb</u> - total 45	D 2 15% A 2 B 4* C 4 E - <u>nb</u> 1 total 13	G 0 C 1 total 1

Abkürzung: nb = nicht bestimmbar.

*Proben, die mit dem B-Peptid reagierten, wurden als kreuzreaktive D-Serotypen gewertet.

°Proben, die mit dem E-Peptid reagierten, wurden als kreuzreaktive C-Serotypen gewertet.

Tabelle 4: Qualität der serologischen Tests

Test	BEH	ICSM	GSH	UFR
korrekt bestimmte	47 von 86 (54,6%)	57 von 83 (68,7%)	55 von 83 (66,3%)	60 von 84 (71,4%)
Subtyp A				
Sensitivität	0,48	0,42	0,4	0,44
Spezifität	0,79	0,95	0,93	0,93
PWpos	0,48	0,77	0,71	0,73
PWneg	0,79	0,8	0,79	0,8
Subtyp C				
Sensitivität	0,51 (0,64)	0,96	0,91 (0,93)	0,96
Spezifität	0,67 (0,62)	0,62	0,5 (0,5)	0,51
PWpos	0,65 (0,67)	0,75	0,66 (0,66)	0,69
PWneg	0,53 (0,59)	0,92	0,84 (0,88)	0,91
Subtyp D				
Sensitivität	0,31	0,17 (0,33)	0,31	0,15 (0,46)
Spezifität	0,97	0,97 (0,97)	0,99	1 (1)
PWpos	0,67	0,5 (0,67)	0,8	1 (1)
PWneg	0,89	0,87 (0,89)	0,89	0,87 (0,91)

*Gesamtzahl unter Berücksichtigung der Kreuzreaktionen - die hierdurch veränderten Werte der berechneten Größen sind in Klammern angegeben. Fett gedruckt sich die jeweils besten Ergebnisse. Abkürzungen: PWpos = positiver prädiktiver Wert; PWneg = negativer prädiktiver Wert.

Von allen 4 untersuchten Tests schnitt der UFR mit 71,4% richtig charakterisierten Proben am besten ab. An zweiter Stelle rangierte der Test aus dem ICSM vor dem Test des GSH und dem ELISA von Behring. Insgesamt war eine starke Kreuzreaktivität zwischen Subtyp A und C zu beobachten. Zwar war die Sensitivität für Subtyp C generell sehr hoch, jedoch wurden zuviele A-Subtypen auch als C bestimmt (geringe Spezifität). Für Subtyp A stellte sich das Problem genau anders herum dar; die meisten Tests waren, wenn sie Subtyp A feststellten, richtig (hohe Spezifität), aber übersahen bis zu 60% aller A-Subtypen (geringe Sensitivität). Die Bestimmung von Subtyp D lag mit einer Sensitivität von unter einem Drittel aller Proben sogar noch unter diesem Wert (siehe auch Tabelle 4). Jedoch war hier die höchste Spezifität für alle Tests. Da alle 4 Tests die fünf Subtypen A-E nachweisen konnten,

gab es auch einige Fehlbestimmungen mit Subtyp B. Hier ist bekannt, daß Subtyp B und D genetisch sehr nahe verwand sind und sich serologisch häufig kaum unterscheiden lassen. Auch besteht eine serologische Ähnlichkeit zwischen Subtyp C und E. Hier kam es ebenfalls zu einigen falsch-positiven Ergebnissen.

Die Probe mb6729, die bei der Sequenzierung den Subtyp G ergab, wurde in den serologischen Tests, die alle nur über die Peptide A bis E verfügten, übereinstimmend als Subtyp C klassifiziert (siehe Abbildung 27). Die Probe mb6836 zeigte in allen vier ELISAs keinerlei Reaktivität, obwohl der HIV-Schnelltest positiv ausfiel.

Consensus G	CTRPNNNTRKSIFT--GPGQ--AFYAT--GDIIGDIRQAHC
	. * . * . * * * * * *
mb6729-g	CVRPDNNTRKSIPI--GPGQ--VIYAT--GEIIGNIRQAHC
	. * . * . * * * * *
Consensus C	CTRPNNNTRKSIRI--GPGQ--TFYAT--GDIIGDIRQAHC

Abb.27: Klassifizierung des Genotyps G als serologischer Subtyp C.

4.1. BEH-ELISA

Obwohl alle 86 Proben mit dem BEH V3-Peptid-ELISA bearbeitet wurden, lieferte der Test bei 4 Proben während der optischen Dichtemessung kein Ergebnis und erlaubte somit nur in 95.3% der Fälle eine Klassifizierung in Subtypen. In über 50% des getesteten Patientenmaterials ließ sich eine beträchtliche Kreuzreaktivität mit dem Peptid des Subtyps E (9,3%) beobachten. Am stärksten ausgeprägt war diese zwischen C- und E-Peptiden. Weiterhin bestand Kreuzreaktivität aber auch zwischen den Subtypen A / E und A / B.

Dieses Testverhalten mußte bei der Interpretation der Ergebnisse gesondert berücksichtigt werden. Dazu wurde bei Kreuzreaktivität zweier Peptide mit einer Differenz von weniger als 25% zwischen dem höchsten und dem zweithöchsten Wert der optischen Dichte folgendermaßen vorgegangen: 100% Reaktivität mit dem A-Peptid und über 75% desselben Wertes beim B-Peptid wurde als Serotyp A definiert (**A / b = A**). 100% Reaktivität mit Peptid B und eine über 75%ige Reaktivität mit dem A-Peptid wurde ebenfalls als Serotyp A definiert (**B / a = A**). Diesem Beispiel entsprechend wurden Proben mit anderen Kreuzreaktionen folgendermaßen beurteilt: **A / e = A**, **E / a = A**, **C / e = C** und **E / c = C**.

Betrag die Kreuzreaktivität mit anderen Peptiden weniger als 75% des höchsten Dichtewertes, so wurde sie vernachlässigt.

Ohne diese Korrektur hätte bei dem ELISA von BEH die Prävalenz von Subtyp E mindestens 45% betragen. Der BEH-ELISA zeigt im Durchschnitt die niedrigste Sensitivität für die Subtypen C und D, wohingegen die Sensitivität für A mit 48% im Vergleich mit allen anderen verwendeten serologischen Tests am höchsten war. Die Subtyp C-Erkennung lag jedoch zugunsten einer Subtyp A-Überschätzung weit unter den Werten aller übrigen ELISAs. Unter Berücksichtigung aller Kreuzreaktivitäten und nach Optimierung des Tests konnten 47 Proben (54.6%) richtig klassifiziert werden.

4.2. ICSM-ELISA

83 der 86 Patientenproben aus Tansania wurden mit dem V3 Peptid-ELISA des ICSM getestet, wobei es bei 5 Proben (6%) zu keinem Ergebnis kam. Bei diesem Test erhärteten sich im Vergleich zu der Nukleinsäuresequenzierung vor allem die zwei folgenden Probleme:

Zum einen wurden 44% der A-Subtypen als C mißgedeutet, und zum anderen war die Sensitivität für Subtyp D mit 17% sehr niedrig. In 5 Fällen (6%) zeigte sich eine starke Kreuzreaktivität sowohl mit den Peptiden von C als auch von Subtyp E. Da aber bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse aller vier ELISAs die Kreuzreaktionen zwischen C und E als Subtyp C und zwischen B und D als Subtyp D interpretiert wurden, konnten 57 Proben dem mit der Genotypisierung übereinstimmenden Subtypen zugeordnet werden (68.7%). Von den vier im Rahmen dieser Studie verwendeten ELISAs hat der ICSM-Test die höchsten Vorhersagewerte für die Subtypen A (77%) und C (75%).

4.3. GSH-ELISA

83 Patientenproben wurden mit dem GSH V3 Peptid-ELISA getestet, von dem 2 Proben jedoch nicht klassifiziert werden konnten (2.4%). Bei der Standard-Verdünnung von 1:100 reagierten die meisten Plasmaproben nicht mit der erwarteten Intensität. Bei der niedrigeren Verdünnungsstufe von 1:10 waren die optischen Dichtewerte stark genug, um zwischen den einzelnen Subtypen unterscheiden zu können. Kreuzreaktivität, vor allem über 90% des Maximalwerts, trat nur selten auf. Kam es aber zu Reaktionen zwischen A und C,

wurde im Sinne eines Subtyps **A** entschieden. Bei Kreuzreaktionen, die zwischen A- und D-Peptiden vorkamen, wurde ein Subtyp **D** gewertet. Verglichen mit den Tests des ICSM und der UFR war dieser ELISA etwas weniger sensitiv für Subtyp C, dafür lag seine Sensitivität für D zusammen mit dem BEH-ELISA am höchsten (31%). Nach den entsprechenden Korrekturen gemäß den beobachteten Kreuzreaktionen entsprachen hier 55 serologisch getestete Proben ihrem Genotyp (66.3%).

4.4. UFR-ELISA

Wegen niedriger Reaktivität konnte eine von 84 Proben (1.2%) nicht durch den V3-Peptid-blockenden ELISA der UFR getestet werden. Außerdem bestanden Probleme bei der Unterscheidung zwischen Subtyp A und C (Sensitivität für A 44%, für C 96%). Die niedrige Sensitivität für Subtyp D (15%) erinnert an den ICSM-ELISA.

In diesem Test wurden allerdings die wenigsten Fälle von Kreuzreaktivität zwischen einzelnen Peptiden beobachtet, was dem Blockierungsprinzip zuzuschreiben sein dürfte. 60 Proben (71.4%) stimmten in serologisch erfaßtem Subtyp und Genotyp überein. Weiterhin erhielt man in diesem Test genau definierte Minimal- und Maximalwerte für jede Probe, was beim Vergleich einzelner Proben untereinander sehr hilfreich ist.

4.5. Konkordanz der serologischen Untersuchungsmethoden

Nur bei 48% der getesteten Proben lieferten die 4 unterschiedlichen ELISAs übereinstimmende Ergebnisse. Die größten Unterschiede bestanden bei der Erkennung von Subtyp C, wobei der ELISA von Behring hier im Vergleich zu den anderen Tests, die mit Werten zwischen 91 und 96% etwa gleich sensitiv waren, mit einer Erkennungsrate von 51% weit zurückfiel. Der BEH-Test war aber wie auch der ELISA des GSH mit 31% erfolgreicher bei der D-Subtypisierung als die anderen Tests mit 15-17%. Läßt man den Test von Behring außer Acht, dann ergibt sich für die ELISAs von ICSM, UFR und GSH eine Konkordanz von 76%; die Methoden des ICSM und der UFR erzielten in 87% der Fälle eine Übereinstimmung in den Ergebnissen. Damit ergibt sich keine signifikante Steigerung des Vorhersagewertes der serologischen Subtypisierung bezogen auf die Genotypisierung, wenn parallel zwei unterschiedliche ELISAs angewendet werden.

5. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse von serologischer und genetischer Subtypisierung

Die oben dargelegten Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zur Subtypisierung von HIV fallen zum Teil durch erhebliche Abweichungen auf. Diese bestehen sowohl zwischen den Resultaten der serologischen und genotypisierenden Untersuchungen, als auch unter den einzelnen ELISAs. Cheingsong-Popov und ihre Arbeitsgruppe veröffentlichte nach Ende der Laborarbeiten zu dieser Studie eine Untersuchung, die das Ergebnis dreier unterschiedlicher serologischer Tests miteinander verglich. Zwei der dabei verwandten ELISAs (ICSM und UFR) wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Um so interessanter erscheint es, daß Cheingsong-Popov im Ergebnisteil darlegt, daß die drei Tests trotz der unterschiedlichen Peptide und Methoden, die zur Bearbeitung nötig sind, einen „hohen Grad an ähnlichen Ergebnissen“ zeigten [32]. Verschiedene Aspekte, die zu den hier gewonnenen Ergebnissen führen, soll im folgenden die Frage beantworten, ob die voneinander abweichenden Werte der verwandten ELISAs die Auswirkung eines niedrigen Vorhersagewerts der benutzten V3-loop Aminosäure-Sequenzen sein könnten. Andererseits könnte die niedrige Konkordanz beispielsweise auch in nicht korrekter Reaktivität der einzelnen Tests begründet liegen.

Zur Festlegung des genetischen Subtyps wurden in dieser Studie Teilabschnitte aus dem *env*-Gen von HIV-1 mit einer Länge von ungefähr 350 Basenpaaren unter Verwendung der Nukleinsäure-Sequenzanalyse herangezogen. Im Vergleich hierzu ist die Subtypisierung mittels serologischer Methoden von einem wesentlich kleineren Genomabschnitt abhängig, der, entsprechend dem jeweils verwandten ELISA, bei rund 40 bis 100 Basenpaaren liegt. Einzelne ausgetauschte Aminosäuren können in diesem kleineren Ausschnitt signifikante Auswirkungen auf die Antigenität des Peptids haben, während Aminosäureänderungen in einem mindestens dreifach größerem Teilstück unter Umständen überhaupt keine Relevanz für die Subtypenbestimmung haben.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß die Genotypisierung mit dem Tripel-Nukleinsäurecode arbeitet, der detailliertere Informationen trägt und insgesamt größere Variationsmöglichkeiten innerhalb eines Subtyps für sich offenhält. Die im Vergleich hierzu über die Abfolge von Aminosäuren festgelegte V3-Serotypisierung bietet weitaus weniger Spielraum.

Bei den Proben, die von allen vier ELISAs fehlgedeutet wurden (n=16), fiel auf, daß es sich in keinem Fall um Proben der genetischen Gruppe C handelte. Es zeigte sich, daß es bei A- und D-Subtypen in der V3-loop-Region nicht die entsprechende Konsensus-Sequenz des jeweiligen Subtyps exprimiert wird. Anstatt dessen ähnelt die Nukleinsäureabfolge in diesem Bereich einem anderen genetischem Subtyp (meist C), was sich auf das Ergebnis der serologischen Untersuchungen entsprechend auswirkte. Erst in periphereren Genomanteilen entsprach die Aminosäureabfolge wieder dem typischen Bild der Konsensus-Sequenz für den jeweiligen Genotyp (Beispiel in Abbildung 28).

		1. Teil: spezifischer für Subtyp D		V3-loop: spezifischer für C
Consensus C		GSLAEEEEIIIRSENLTNNVKTIIIVHLNESVEIV		CTRPNNNTRKSIRIGPGQ
		* * * * *		* * *
mb6853		GSLAEKEIIVRSENLTNNAKTIIVQLNESVTIN		CTRPNNNTRKSIRIGPGQ
		* * * *		* * * * *
Consensus D		GSLAEEEEIIIRSENLTNNAKIIIVQLNESVTIN		CTRPYNNTRQORTHIGPGQ
		V3-loop		3. Teil: spezifischer für Subtyp D
Consensus C		TFYATGDIIGDIRQAHC		NISKDKWNETLQRVGKKLAEHFPNKT
				*** * * * *
mb6853		TFYATGDIIGDIRQAHC		NISGTGWNKTLQQVAKKLGDLL-NQT
		* * * *		* * *
Consensus D		ALYTT-RIIGDIRQAHC		NISGAEWNKTLQQVAKKLGDLL-NKT

(* kennzeichnet Aminosäuren, die nicht mit der jeweiligen Konsensussequenz übereinstimmen)

Abb. 28: Mosaikstruktur der Probe mb6853.

In dieser Mosaik-Struktur innerhalb des *env*-Gens liegt die Erklärung für die großen Diskrepanzen zwischen serologischer und genetischer Subtypisierung. Um diesen Hinweis weiter zu evaluieren, wurde in einem nächsten Schritt die V3-loop-Aminosäuresequenz jeder Probe mit den im ELISA verwendeten Peptiden verglichen, um die Unstimmigkeit zwischen beiden beurteilen zu können. Exemplarisch bot sich hierfür der UFR-Test an, da er mit 30 Aminosäuren die längsten Peptidketten nutzte und somit ein entsprechend größerer Ausblick auf die Relevanz der V3-loop-Aminosäuren für die serologische Analyse erzielt werden konnte.

Alle 14 Proben, die genetisch dem Subtyp A zugehörig sind, im UFR-ELISA aber nicht als A erkannt worden waren, hatten eine V3-loop-Aminosäuresequenz, die am besten dem Subtyp-C-Konsensus entsprach und wurden dadurch folgerichtig als Subtyp C klassifiziert. Selbiges gilt auch für die sechs nicht richtig erkannten Proben vom genetischen Subtyp D, die alle

atypische Subtyp-D-Sequenzen im V3-loop aufzeigten und daher entweder als A- oder C-Subtyp verkannt wurden (Abbildung 29). Durch die Analyse der vom Konsensus abweichenden Aminosäuren bei falsch zugewiesenen Proben konnten drei Aminosäure-Positionen bestimmt werden, die für die Festlegung des serologischen Subtyps entscheidend sind.

V3-loop Position	1	5	10	15	20	25	30	35	
Consensus A	C	T	R	P	N	N	N	T	UFR
mb6567-a	.	I	C
mb6657-a	.	K	.	D	I	K	.	T	C
mb6678-a	C
mb6737-a	.	.	G	C
mb6771-a	C
mb6774-a	C
mb6791-a	C
mb6839-a	C
mb6847-a	C
mb6874-a	C
mb6937-a	C
mb7032-a	C
mb7035-a	C
mb9005-a	C
Consensus D	C	T	R	P	Y	N	N	T	
mb6675-d	.	V	C
mb6853-d	C
mb6950-d	C
mb6953-d	CA
mb6958-d	A
mb6961-d	.	M	C
Consensus G	C	T	R	P	N	N	N	T	
mb6729-g	.	T	C

Abb. 29: Aminosäuren im V3-loop bei Proben, die vom UFR-ELISA fehlinterpretiert wurden.

5.1. Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps A

Unabhängig davon, welchem Genotyp der V3-loop-Antikörper in der jeweiligen Patientenprobe wirklich entspricht, reagiert eine Probe dann am stärksten mit dem Subtyp-A-Peptid eines ELISAs, wenn folgende spezielle Aminosäure-Kombinationen vorliegen: Valin *V* an Position 12 in Kombination mit Histidin *H* an Position 13 im V3-loop. Außerdem führt eine dieser Aminosäuren (Valin oder Histidin) in Verbindung mit Alanin *A* an Position 19 in den häufigsten Fällen zu einer Klassifizierung als Subtyp A. Werden eng miteinander

verwandte Aminosäuren ausgetauscht (wie beispielsweise das um ein Kohlenstoffatom reichere Leucin *L* anstatt Valin *V* an Position 12), so wird die Bindungsaffinität und somit auch das Testergebnis nicht relevant verändert (Abbildung 30).

V3-loop-Position	10	15	20	serologisches Ergebnis										
				BEH	ICSM	GSH	UFR							
Consensus A	R	K	S	V	R	I	G	P	G	A	F	Y	A	T
mb6631-a	..G.H.-	-.....	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6703-a	-.....	-.....	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6738-a	.R.....	-.....	-.....	A	A	AC	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6746-a	.RGL..R-	...F.M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6831-aH.-	-.....	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6837-a	.T.IH.-	-.....	C	A	AC	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA
mb6847-a	...IH.-	-.....	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C
mb6938-a	..G.S.-	-.....	A	D	C	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6979-a	IRG.H.-	-T....	-	nt	C	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6981-a	.R..HM-	-.....	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6984-aH.-	-.....	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
mb9008-a	.T..S.-	-.....	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A
mb6806-d	.RG.H.-	-Y.T.	A	A	A	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
mb6958-d	..GIH.-	-...FT.	-	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A

Abb. 30: Proben, die in den meisten ELISAs als Subtyp A klassifiziert wurden.

Bei den in der vorliegenden Studie verwandten vier ELISAs zeigten die Tests der UFR (100%), des ICSM (92%) und des GSH (83%) die höchste Übereinstimmung zwischen der „richtigen Besetzung“ der oben genannten drei Aminosäure-Positionen und dem serologischen Ergebnis. Der geringere Vorhersagewert des BEH-ELISAs dürfte demnach in der Besetzung der Position 12 des A-Peptids mit Isoleucin *I* anstelle von Valin *V* begründet liegen.

5.2. Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps C

Analog zu den A-Subtypen wurden folgende drei Aminosäure-Kombinationen ermittelt, die für die Festlegung eines Subtyps C spezifisch sind: Isoleucin *I* an Position 12, Arginin *R* an Position 13 und Threonin *T* an Position 19 im V3-loop. In 19% der Subtyp C Sequenzen findet sich an Position 12 die schwefelhaltige Aminosäure Methionin *M*. Die Proben mit diesem Aminosäureaustausch wurden von nahezu allen ELISAs richtig

klassifiziert, so daß vermutet werden muß, daß mit Arginin *R* an Position 13 ein Methionin *M* anstatt Isoleucin *I* an zwölfter Stelle im V3-loop ohne Fehlklassifikation des Subtyps stehen kann (Abbildung 31).

V3-loop-Position	10	15	20	serologisches Ergebnis										
				BEH	ICSM	GSH	UFR							
Consensus C	R	K	S	I	R	G	P	G	Q	T	F	Y	A	T
mb6568
mb6583	.	R
mb6663
mb6666
mb6734
mb6777
mb6789
mb6884
mb6959	.	Q
mb6983
mb7034
mb9006
mb9012
mb9013

Abb. 31: Proben, die in nahezu allen ELISAs richtig als Subtyp C klassifiziert wurden.

Von 60 Proben mit jeweils einer entsprechenden Aminosäure an den benannten Positionen wurden vom UFR-ELISA 58 (97%) richtig als Subtyp C klassifiziert. Der ICSM-Test und der GSH-Test brachten es auf 55 von 58 (95%) respektive 51 von 57 (89%). Im ELISA von Behring konnte ein solcher Zusammenhang zwischen der bestimmten Besetzung definierter V3-loop-Positionen und der richtigen Zuordnung des Subtyps nicht nachgewiesen werden; hier wurden 62% der Proben als Subtyp C klassifiziert, aber auch 25% als Subtyp A, 10% als Subtyp E und 3% als Subtyp B gewertet.

5.3. Schlüssel-Aminosäuren zur serologischen Erkennung des HIV-1 Subtyps D

Von allen 86 Patientenproben zeigte nur eine (mb6955) eine Aminosäureabfolge, die der Subtyp D-Konsensussequenz im V3-loop sehr ähnlich war; diese Probe wurde von allen vier ELISAs korrekt als Subtyp D klassifiziert. Von zwei Tests wurden außerdem auch mb2975 und mb6954 richtig als Subtyp D erkannt (siehe Abbildung 32).

V3-loop-Position	10	15	20	serologisches Ergebnis				
Consensus D	RQ	RTHI	.GPGQ	.ALYTT	BEH	ICSM	GSH	UFR
mb2975-d	..T.S.--.Q	..--S	...M	nt	-	D	D	
mb6954-d	..SIR.--	--TF...	nt	D	AB	D	
mb6955-d	..S	...--	--...S.	-	D	D	D
mb6836-d	.KY.YMGL	.K.K--	.Y...	nt	nt	nt	nt	

Abb. 32

Aufgrund der extrem hohen Heterogenität des Subtyp D-Genoms bereitete die richtige Klassifizierung insgesamt allen serologischen Tests erhebliche Schwierigkeiten. Die höchste Korrelation zwischen Genotyp und serologisch bestimmtem Subtyp D konnte im GSH-Test beobachtet werden.

Da die Anzahl der Subtyp-D-Proben insgesamt relativ gering ist (n=13), läßt sich keine gültige Korrelation zwischen spezifischen Aminosäure-Positionen und der Erkennung von D-Subtypen durch die serologische Analyse aufdecken. Einige Patientenproben, die in den ELISAs als Subtyp D gewertet wurden, hatten typischerweise Glutamin *Q* an Position 10. Dieses Glutamin scheint bisweilen für die Zuordnung einer Probe zu Subtyp D mehr Relevanz zu besitzen als alle übrigen Aminosäuren des V3-loops. So wurde die Probe mb2975, obwohl ihre Struktur viel mehr Ähnlichkeit mit der C-Konsensussequenz aufzeigt, entsprechend des Glutamins an Position 10 als Subtyp D eingestuft. In 6 Fällen konnte ferner bei verschiedenen ELISAs eine Kreuzreaktivität zwischen den D-Genotypen und den B-Peptiden der Tests beobachtet werden.

Die Probe mb6836 konnte von keinem der Tests in irgend einer Weise klassifiziert werden. Dies dürfte einmal damit zusammenhängen, daß der zum größten Teil atypisch besetzte V3-loop keine Entsprechung in den Peptiden der ELISAs findet. Zum anderen gilt die Überlegung, daß durch den erheblichen Aminosäureaustausch in dieser Probe die Konformation der V3-Region soweit verändert ist, daß diese nicht an der Virenoberfläche zu liegen kommt und es dadurch keine gegen diese Region gerichteten Antikörper gibt.

V DISKUSSION

1. Wertigkeit serologischer Tests

1.1. Argumente für und gegen die zuverlässige Vorhersagekraft von serologischen Untersuchungsmethoden

Seit der Einführung einer Unterteilung von HI-Viren in Subtypen war es immer von großem Interesse, in umfassenden epidemiologischen Studien die Verteilung dieser Subtypen zu erfassen. Ob solche Studien auch mittels serologischer Tests durchgeführt werden können und die Ergebnisse hinreichend zuverlässig den Genotyp eines Virus vorhersagen, wird kontrovers diskutiert.

Durch einfache Handhabung und vergleichsweise unkomplizierte Rahmenbedingungen heben sich serologische Tests von anderen Labormethoden ab. Die hier verwandten ELISAs weisen eine Bindung der im Patientenserum vorhandenen Antikörper an korrespondierende synthetische V3-loop-Peptide nach. Damit spiegeln sie die antigenetischen Eigenschaften des Virus innerhalb eines Abschnittes des *env*-Gens wieder. Die V3-loop-Region wurde als Gegenstand der serologischen Subtypenanalyse vor allem aus dem Grund gewählt, da sie die stärkste nachweisbare Immunreaktion innerhalb von gp120 hervorruft. Außerdem ist der V3-loop in viele Wirt-Virus-Interaktionen einbezogen und verspricht sogleich, der ideale Abschnitt zu sein, um biologische Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen herauszufinden.

Die beschränkte Aussagefähigkeit eines V3-loop-ELISA's besteht darin, dass mit dem V3-loop nur eine Region von 100 Nukleotiden / bzw. 20-30 Aminosäuren zur Subtypen-determinierung herangezogen wird, was 1% des kompletten Virusgenoms ausmacht. Somit kann zwar die Subtypenzugehörigkeit der V3-loop-Region festgestellt werden, nicht aber die anderer Abschnitte des HIV-Genoms. Weiterhin ist der V3-loop eine Region im Genom, die einem hohen Immundruck ausgesetzt ist und einen der variabelsten Abschnitte im HIV-Genom ausmacht. Dadurch scheint es nicht verwunderlich, dass serologische V3-Typisierungstests auch ihre Grenzen haben. Außerdem kommt es zwischen den Subtypen der verschiedenen Konsensussequenzen, die in den ELISAs verwendet werden, häufig Kreuzreaktionen. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sich die Peptide, die zur

Serotypisierung herangezogen werden, in nur zwei bis vier Aminosäuren voneinander unterscheiden.

Auch bei der öffentlichen Diskussion der Wertigkeit serologischer Tests gehen die Meinungen auseinander. Einerseits hält sich der Standpunkt, es könnten mit Hilfe von ELISAs neben der zuverlässigen Bestimmung des Subtyps B und vor allem E [31][100][122][157][174][228] im günstigsten Falle die Subtypen A und C von B, D und E unterschieden werden; 1:1-Korrespondenzen würden aber in allen anderen Fällen ausbleiben [157]. Als Erklärung für die Unstimmigkeiten zwischen Serotyp und Genotyp wird angegeben, dass der V3-loop nicht allein das wichtigste Epitop für neutralisierende Antikörper darstellt. Darüber hinaus müssten auch monoklonale Antikörper berücksichtigt werden, die subtypenunabhängig primäre HIV-Stränge neutralisieren [122]. Auch wird kritisiert, dass bei serologischen Tests die im Serum vorhandenen Antikörperpopulationen prinzipiell an eine ganze Reihe von Peptiden des Tests gerichtet sind, denn ein synthetisch konstruierter Aminosäureabschnitt zur Erkennung eines spezifischen Subtyps stellt eigentlich einen Durchschnitt „typischer“ Sequenzen dar. Damit liegt es auf der Hand, dass sowohl andere Subtypen mit dem Konstrukt reagieren, als auch eine Antikörperpopulation mit mehreren Test-Peptiden kreuzreagiert, weil ein Teil der „gemittelten“ Aminosäuren mit der eigenen Sequenz kompatibel ist [174].

Entgegen all dieser Argumente steht die Pilotstudie der WHO, in der 1994 Patientenproben aus Uganda, Ruanda, Thailand und Brasilien mit einem V3-Peptid-ELISA klassifiziert und die Ergebnisse mit den Sequenzierungsdaten verglichen wurden [31]. Bei den Subtypen A, B, C und E konnte in 90% der Fälle (n=50) der Genotyp durch den serologischen Test bestätigt werden. Bei Subtyp D (n=12), der in seiner Aminosäuresequenz am häufigsten und ausgedehntesten variiert, lag das Ergebnis für die korrekte Klassifikation bei 67%. Damit wurde gezeigt, dass serologische Untersuchungen durchaus zu Fragestellungen über die Vielfältigkeit von HIV in einer Population herangezogen werden können. Einschränkungen müssten hierbei jedoch in gewissem Umfang gemacht werden. So wurden die Subtypen A und C zu einer serologischen Gruppe zusammengezogen, was aber der nahen Verwandtschaft der beiden Subtypen auch auf genetischer Basis entspricht. Kreuzreaktionen ließen sich auch bei Proben des Genotyps D in 25% zwischen B und D beobachten.

1.2. Evaluierung von Problemen der ELISAs durch den Vergleich von Ergebnissen mit einer Fremdstudie

Cheingsong-Popov et al. [32] präsentierte vier Jahre später unter anderem nochmals eine Studie, die die Beziehung zwischen Serotypisierung und genetischen Subtypen zum Thema hat. Hierin wurden 125 Proben wiederum aus Uganda, Burundi, Thailand und Brasilien genotypisiert und mit drei verschiedenen ELISAs serotypisiert. Die Ergebnisse wurden ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit untereinander verglichen. Ein enger Zusammenhang der Serotypen bestand bei den genetischen Subtypen B (je nach Test 59-79%), C (75-100%) und E (83-96%). Bei den Daten für die Subtypen A und D musste ein hoher Anteil an Kreuzreaktionen berücksichtigt werden. So enthielt der Subtyp A die Serotypen A (40-50%) und C (33-54%); gleichermaßen wurde im Falle von Subtyp D verfahren: Serotyp B (30-50%) und D (45-60%). Diese Studie besticht vor allem dadurch, dass die Proben hier unter anderem auch mit den ELISAs der ICSM und der UFR untersucht wurden, was einen Vergleich der entsprechenden Daten mit den eigenen Ergebnissen anbietet (siehe auch Tabelle 5).

Im Vergleich zu den Daten von Cheingsong-Popov erscheinen die Subtypisierungsergebnisse der Patientenproben aus Tansania zumindest auf den ersten Blick recht unterschiedlich. Dies ist im Falle der A-Seren noch am wenigsten ausgeprägt. Hier gibt es zwischen den Werten der zwei in beiden Studien verwandten ELISAs mit 50% / 40% (Cheing.-P.) beziehungsweise 42% / 44% (TZ) keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls in vergleichbarem Rahmen liegen die Fehltypisierungen der A-Seren, bei denen in allen Untersuchungen vor allem der Subtyp C bevorzugt wurde. Dies stimmt mit Beobachtungen von Korber et al. [120] überein, dass nämlich diese beiden Subtypen trotz voneinander abweichenden Nukleinsäuresequenzen gerade im V3-loop eine bemerkenswerte Ähnlichkeit aufweisen. Dabei scheint die Regel zu sein, dass dies ein „Einbahn-Phänomen“ [32] ist, da in den meisten Fällen A-Subtypen fälschlicherweise als C gewertet werden, selten aber umgekehrt.

Somit zeichnet es die Qualität eines Testes aus, wenn vor allem die eben erwähnten Subtypen korrekt klassifiziert werden. Je höher jedoch die Anzahl dieser kritischen Gruppen ist, die die ELISAs unterscheiden müssen, um so mehr Proben können bei der Unterscheidung falsch zugeordnet werden.

Tabelle 5: Vergleich von Sertotypisierungsergebnissen zwischen der Studie von Cheingsong-Popov et al. [32] und der vorliegenden Arbeit

	Subtyp A		Subtyp C		Subtyp D	
	Cheings.- P.	Hanker	Cheings.- P.	Hanker	Cheings.- P.	Hanker
ICSM	A 18 50% C 12 D 4 E 1 <u>nt 1</u> n=36	A 10 42% C 11 D 2 <u>nt 1</u> n=24	C 1 25% AC 2 <u>nt -</u> n= 3	C 43 96% <u>nt 2</u> n=45	D 12 60% A 1 B 6 <u>nt 1</u> n=20	D 2 17% A 3 B 2 C 3 <u>nt 2</u> n=12
UFR	A 14 40% B 1 C 19 D 1 <u>nt -</u> n=35	A 11 44% C 14 <u>nt -</u> n=25	C 4 100% <u>nt -</u> n= 4	C 43 96% A 2 <u>nt -</u> n=45	D 9 45% A 1 B 10 <u>nt -</u> n=20	D 2 15% A 2 B 4 C 4 <u>nt 1</u> n=13

Bei den Proben des Subtyps C muss etwas genauer auf den Unterschied in beiden Studien eingegangen werden. Den direkten Vergleich behindert die niedrige Gesamtzahl (n=4) von C-Subtypen in der fremden Untersuchung, von denen 25% / bzw. 100% korrekt klassifiziert wurden. Dahingegen war C in den Patientenproben aus Tansania mit insgesamt 47 (55%) Fällen der dominierende Subtyp. Die Tests erkannten jeweils 96% aller C-Subtypen richtig. Sieht man die vorliegende Untersuchung als Ergänzung der Studie von Cheingsong-Popov, dann könnte sie den Trend, der sich schon bei geringen Fallzahlen abzeichnet, fortsetzen und belegen, dass serologisch determinierte C Subtypen in hohem Maße ihrem Genotyp entsprechen.

Hinsichtlich der D-Seren zeigen sich in beiden Untersuchungen die größten Unterschiede. 60% / 45% (Cheings.-P.) richtig erkannte D-Subtypen stehen nur jeweils 15% (TZ) gegenüber. Natürlich gilt es zu berücksichtigen, dass der V3-loop von D unter allen Subtypen die höchste Rate an Variabilität aufweist und die Aminosäureabfolge in dieser Region somit weniger konserviert ist und dann auch seltener der D-Konsensussequenz entspricht. Beachtet

man den hohen Anteil an Kreuzreaktivität, der bewirkt, dass Proben des Subtyps D häufiger als Subtyp B denn als korrektes D gewertet werden, so ist man versucht, dies auch als Erklärung für den niedrigen Vorhersagewert zu akzeptieren. Ob es einen Einfluss auf die Kreuzreaktionen hat, wenn in den Serumproben, die getestet werden, ein hoher Prozentsatz an realen B-Subtypen vorhanden ist, stellt eine interessante Frage dar. Denkbar wäre, dass bei der Auswertung der ELISAs die optische Dichte der „echten“ B-Serotypen Werte vorgeben, die von den kreuzreaktiven D-Subtypen nicht in vollem Umfang erreicht werden. Somit könnten im Vergleich schließlich mehr Proben vom Serotyp D richtig klassifiziert werden. Dies würde auch den erheblichen Unterschied im Ergebnis der tansanischen D-Seren zu der Untersuchung von Cheingsong-Popov erklären, da im Kollektiv der erstgenannten Proben überhaupt kein Genotyp B nachweisbar war.

2. Wertung der Ergebnisse

Innerhalb des V3-loop-Peptids haben die Aminosäurereste 12, 13 und 19 offensichtlich die größte Bedeutung für die Antikörperanlagerung und sind daher essentiell für die Subtypenunterscheidung durch ELISAs. Dies wiegt besonders schwer bei der Differenzierung zwischen den bekanntermaßen schwierig zu unterscheidenden Subtypen A und C. Für die Erkennung des Subtyps D könnten die Positionen 10, 11, 19 und 20 wichtig sein, aber die Anzahl der Proben in der Studie war für einer Sicherung dieser Annahme nicht hoch genug.

Dem eben Gesagtem entsprechend, wirken sich Mutationen, die nicht an den beschriebenen Schlüsselstellen von statten gehen, nicht relevant auf die subtypenspezifische Antigenität aus. Nichtsdestotrotz wäre es möglich, dass in gewissem Umfang andere Regionen des gp 160 außerhalb des V3-loops die Antikörperkonformation und -erkennung beeinflussen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Langedijk [129] überein, der zeigte, dass Mutationen in einem infizierten Individuum innerhalb des V3-loops vorzugsweise in bestimmten Positionen auftreten und die Bindungskapazität der zirkulierenden Antikörper beeinflussen. Dann könnte man erwarten, dass während dem Infektionsverlauf eine Änderung im Antikörperbindungsmuster vor sich geht und dies eine Subtypenidentifizierung beeinträchtigt.

3. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse bei serologischer und genetischer Subtypisierung

Einer der Gründe für die eingeschränkte Übereinstimmung zwischen serologischer und genetischer Subtypisierung könnte in unserer Studie sein, dass das Plasma von Patienten stammt, die sich schon in einem späten Stadium ihrer Erkrankung befinden. Alle Patienten hatten wenigstens 3 Symptome der WHO-AIDS-Klassifikation. Es ist möglich, dass ein großer Teil der zirkulierenden Antikörper immer noch gegen den ursprünglichen Virenstamm gerichtet ist, während Mutationen das Virusgenom im Krankheitsverlauf schon soweit verändert haben, dass es besser zur Konsensussequenz eines anderen Subtypen passt. Eine schon lange Zeit bestehende Immunreaktion wirkt als antreibende Kraft für Variationen [146]. Zusammen mit der hohen Wahrscheinlichkeit, durch die PCR gerade die neuen mutierten Virusvarianten repliziert zu haben, auf die das Immunsystem noch nicht reagiert hat, wäre die Basis für eine serologische Fehlklassifizierung bereitet.

Bei weit fortgeschrittener HIV-Infektion besteht weiterhin die Möglichkeit, dass durch die direkte Auswirkung der Krankheit die Menge an funktionsfähigen Antikörpern, die spezifisch für jeweils ein Antigen gebildet werden, bereits erheblich reduziert und deren Nachweis somit zusätzlich erschwert ist.

Ein weiterer Grund für unterschiedliche Ergebnisse bei Sequenzanalyse und serologischer Subtypenbestimmung könnte die Infektion mit zwei verschiedenen Subtypen bei einem Patienten sein. Da die Sequenzanalyse mittels direkter PCR durchgeführt wurde, könnten Doppelinfektionen übersehen worden sein. In noch nicht veröffentlichten Studien von Hoelscher sind 10-25% aller HIV-Infizierten in Mbeya, Tansania, mit mehr als einem HIV-Subtypen infiziert. Da das Immunsystem jedoch auf jede Infektion antwortet, könnte dadurch die Zahl der doppelreagierenden Seren erklärt werden. Durch diese hohe Zahl an Doppelinfektionen lässt sich auch die noch wesentlich höhere Zahl an rekombinanten Viren (55%) erklären [94]

Wie von Pau et al. beschrieben [174], bestünde auch die Möglichkeit, dass ein - aus Zellen des peripheren Kreislaufs isoliertes - Virus eine Variante darstellt, die dem Immunsystem entkommen konnte. Die Antikörper, die man in solch einem Fall im Serum findet, könnten

gegen einen Virus gerichtet sein, der durch das körpereigene Abwehrsystem erkannt wurde und vielleicht gar nicht mehr im Organismus nachzuweisen ist.

Trotz alledem ist der Grund, dass es zwischen serologischer und genetischer Subtypisierung so große Unterschiede gibt, vor allem an dem limitierten Vorhersagewert der V3-loop-Aminosäuresequenz für den Genotyp zu suchen. Es wäre vergleichsweise problematisch, zwischen einzelnen Viren zu unterscheiden, wenn die genetischen Subtypen nur durch die Analyse der Aminosäuresequenz des V3-loops durchgeführt werden würde. Wie Korber zeigte, haben die Subtypen A und C teilweise die Tendenz, sehr ähnliche Aminosäuresequenzen innerhalb des V3-loop zu exprimieren, obwohl die Sequenzen, die an diese Region grenzen, höchst unterschiedlich sein können [120]. Wir beobachteten dieses Phänomen auch bei Subtyp D: 46% der Subtyp D-Sequenzen beinhalten Aminosäureabfolgen, die innerhalb des V3-loops sehr ähnlich zu der Konsensussequenz von Subtyp C ist, in den beiden flankierenden Regionen aber ganz klar zu Subtyp D gehören.

Es gibt drei mögliche Erklärungen für solch ein Verhalten: Zum einen könnte ein Virusgenom mit erfolgreichen Eigenschaften der gemeinsame Vorläufer mehrerer Subtypen sein, was dem *Fehlen von Divergenz* entspräche. Die Möglichkeit der *Konvergenz* besteht bei Viren, die eine bestimmte Aminosäurestruktur exprimieren und bei der Infektion eines neuen Wirtes einen Selektionsvorteil haben oder dem Immunsystem entkommen; zuletzt muss man auch an *Rekombinationen* denken, bei denen Viren vorzugsweise nur den V3-loop austauschen.

Mit den relativ begrenzten Daten, die hier zur Verfügung stehen, können wir dieses Phänomen nicht ausreichend erklären. Hierzu wären längere Sequenzabschnitte und auch Sequenzierungsdaten von Proben, die aus einer frühen Phase der Infektion gewonnen wurden, nötig.

4. Regionale Besonderheiten

Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass die Epidemie in der Mbeya-Region relativ alt ist, und dass die unterschiedlichen genetischen Subtypen die Möglichkeit hatten, sich untereinander zu rekombinieren, was nun ihre Unterscheidung erschwert. Tansania liegt in einer Region, die weltweit sowohl die höchste Prävalenzrate an HIV-Infektionen aufweist, als auch vom Vorkommen aller bekannten Subtypen, Virusgruppen und -typen gekennzeichnet

ist. In den bis 1998 veröffentlichten Studien über das Subtypenvorkommen in Tansania wurde zunächst nur von den Klassen A und D berichtet [91][188][207][244], wobei sich die Untersuchungen auf den nördlichen Landesteil konzentrierten. Unsere Arbeitsgruppe hingegen kann in Proben aus dem im Süden des Landes gelegenen Mbeya den HIV Subtyp C schon seit 1988 nachweisen, in der vorliegenden Arbeit ist der genetische Subtyp C mit 47 von 86 Proben (55%) sogar vorherrschend. Des weiteren wurde auch eine Probe des Subtyps G identifiziert. Die geographische Nähe vom Mbeya zu Malawi und Zambia, beides Länder mit Subtyp-C-Epidemien von nahezu 100%, scheint die Epidemie in Mbeya beeinflusst zu haben (siehe auch Abbildung 33). Dagegen wird die Subtypenverteilung im Norden Tansanias offensichtlich mehr durch die Epidemien in Uganda und Kenia beeinflusst. Erst in späteren Untersuchungen konnte von Refjio et al. [186] ab 1998 auch in nördlichen Landesteilen der Subtyp C gefunden werden.

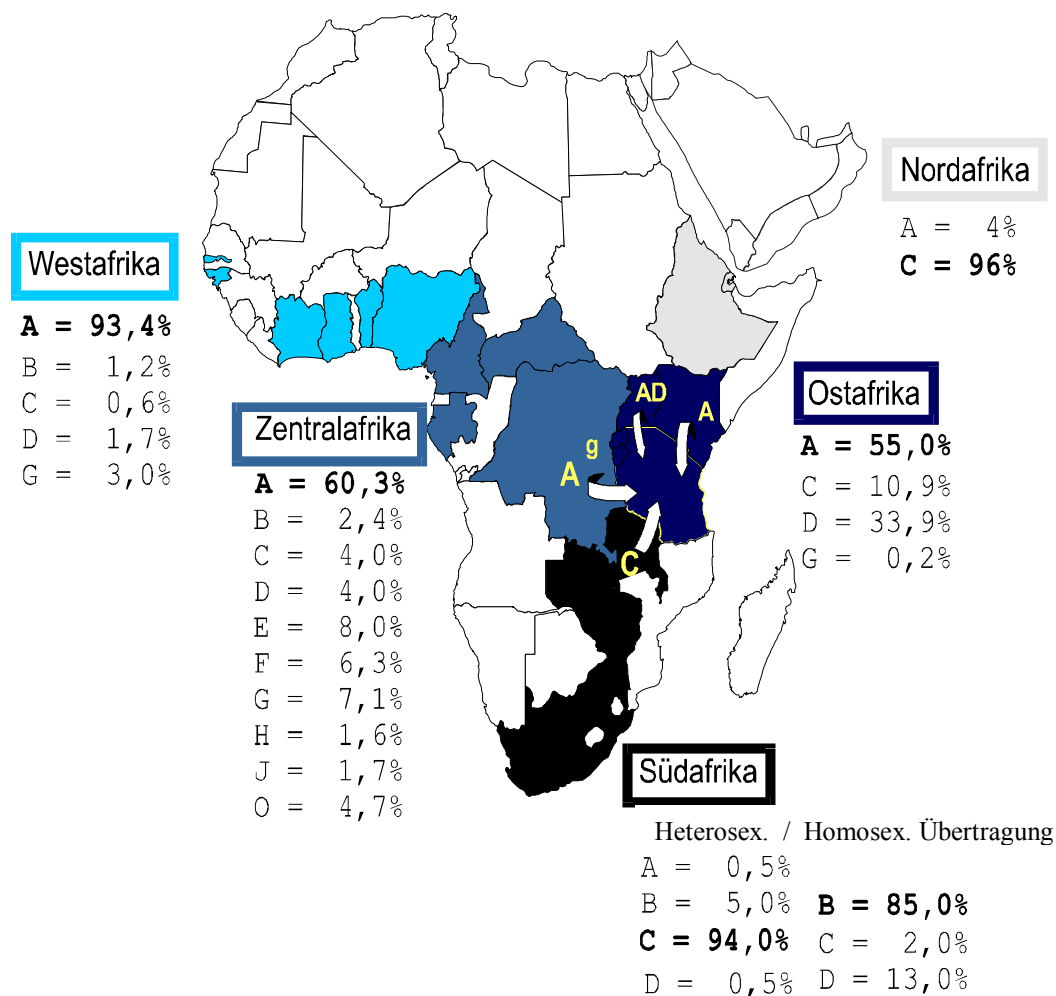


Abb. 33: HIV-Subtypenvorkommen in verschiedenen Regionen Afrikas [240]

5. Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen Serotyp und Genotyp demonstriert werden: V3-Serotypisierungstests sagen mit hoher Verlässlichkeit die Aminosäurestruktur der analysierten Probe, speziell der V3-loop-Region, vorher. Die Existenz von sehr ähnlichen V3-loop-Aminosäuresequenzen bei den verschiedenen Genotypen wird sich immer in Unterschieden zwischen serologischen Subtypen und genetischen Subtypen bemerkbar machen. Beide Klassifikationen unterscheiden sich voneinander. Bei Subtypen, deren serologische Attribute eng mit dem viralen Genotyp assoziiert sind, können V3-loop-ELISAs erfolgreich angewendet werden, um die unterschiedlichen Genotypen zu differenzieren. Beispiele hierzu gibt es bei den thailändischen Subtypen B und E [Wasi] und für B und C in Russland [144], Israel [70] oder Südafrika [227].

Die V3-Serotypisierung ist auf der anderen Seite wenig geeignet, A von C und B von D-Genotypen zu unterscheiden. Daten, die in solchen Fällen von serologischen Tests stammen, sollten als zusätzliche Information mit unabhängigem Wert angesehen und nicht mit dem Ziel eingesetzt werden, in jeder Probe den genetischen Subtyp eines Virus vorherzusagen.

Wenn die V3-Serotypisierung benützt wird, um Genotypen in groß angelegten Studien vorherzusagen, dann sollten zusätzlich genetische Subtypisierungen durchgeführt werden. Ein Algorithmus wäre erforderlich, in dem ein repräsentativer Anteil der Proben durch die Nukleinsäuresequenzanalyse charakterisiert wird. So erschließen sich regionale Besonderheiten wie beispielsweise ungewöhnliche Rekombinationen. Diese Daten können dann herangezogen werden, um den Grad der Übereinstimmung der serologischen Subtypen und der Genotypen in der speziellen Studie zu identifizieren. Statistische Methoden sollten dann genutzt werden, um die korrekte Subtypenprävalenz der gesamten Anzahl von Proben, die nur mittels serologischer Tests bearbeitet wurden, herauszufinden.

Um dem nach wie vor bestehenden Problem, kostengünstig und zuverlässig große Probenmengen zu untersuchen, beizukommen, werden immer neue Untersuchungsverfahren entwickelt (z.B. der Combinatory Melting Assay CoMA [123] zur genetischen Subtypisierung oder verbesserte kompetitive Peptid-Enzym-Immunoassays [189]), die in groß angelegten Studien mit DNA/RNA-Isolation aus Serum oder Plasma genutzt werden können). Gänzlich neue Testverfahren sollen detailliertere Informationen über die

analysierten Virusgenome liefern (Multi-Region Hybridization Assay MHA) [95] und eine Annäherung an das Problem der effizienten Durchführbarkeit mit sich bringen.

VI Zusammenfassung

Leider lassen sich die zwei einzelnen Teilwörter, die die neue Forschungsrichtung „molekulare“ „Epidemiologie“ bezeichnen, bis heute noch nicht vollständig vereinen. So zielt das Wort „molekulare“ auf eine möglichst detaillierte Untersuchung ab. Das Wort „Epidemiologie“ jedoch auf eine möglichst statistisch repräsentative Probenzahl. Bei der molekularen / genetischen Subtypenanalyse ist die Gesamtgenomsequenzierung der Goldstandard. Da eine solche Untersuchung jedoch zeitaufwendig und sehr teuer ist kommt sie jedoch meistens nur bei sogenannten „convenient samples“, also leicht verfügbaren Patientenproben zum Einsatz. Dies widerspricht jedoch diametral dem Sinn einer epidemiologischen Untersuchung, in der man Bias unter allen Umständen vermeiden will. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden zur Schnelltypisierung von HIV entwickelt.

Der V3-loop ELISA entsprach hierbei am meisten einem Instrument, das sich epidemiologisch einsetzen ließ, da es kostengünstig und unkompliziert einsetzbar war. Aufgrund einer Antikörperbindung an V3-loop-Peptide, aus dem ein *env*-Abschnitt des genetischen Subtyps generiert wurde, erfolgt die Zuordnung einer Probe zu einem bestimmten Serotyp.

Ziel dieser Studie war es, abzuklären, wie verlässlich die Serotypisierung von HIV-1 die in einem ostafrikanischen Land vorkommenden, seit Jahren nebeneinander existierenden, unterschiedlichen Genotypen bestimmen kann. Die genetischen Subtypen von 86 AIDS-Patienten aus Mbeya-Stadt im südwestlichen Tansania wurden durch die Nukleinsäuresequenzierung eines *env*-Abschnittes bestimmt und dienten als Grundlage für das weitere Vorgehen. Die Daten wurden mit den Ergebnissen der V3-Serotypisierung verglichen, welche durch vier verschiedene Testverfahren erhoben wurden. In den zur Verfügung stehenden Patientenproben konnten vier genetische Subtypen von HIV-1 identifiziert werden: A (25, 29%), C (47, 55%), D (13, 15%) und G (1, 1%).

Im Vergleich der serologischen Tests untereinander konnte gezeigt werden, dass Sensitivität und Spezifität der verwandten ELISAs beträchtlich variieren. So lag die Sensitivität abhängig vom jeweiligen Test in Falle von Subtyp A bei 40 - 48%, bei C ergaben sich 52 - 96% und bei D 9 - 31%. Die Spezifität ergab für A 77 - 95%, für C 46 - 63% und für D 97 - 100%.

Es wurde nach einer Erklärung für dieses Testverhalten gesucht. Mittels logistischer Regressionsanalyse wurden drei Aminosäurereste im V3-loop identifiziert, die größte Bedeutung für eine erfolgreiche und gleichzeitig spezifische Antikörperbindung haben (Position 12, 13 und 19: Valin *V*, Histidin *H* und Alanin *A* für Subtyp A; Isoleucin *I*, Arginin *R* und Threonin *T* für C). Abweichungen von diesen Subtyp-spezifischen Aminosäuren waren in hohem Umfang mit einer serologischen Fehlklassifizierung verbunden.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Tests zumindest auf Populationsebene die Subtypenverteilung in den richtigen Proportionen vorhersagen (bester serologischer Test A 18%; C 74%, D 9%, genetische Subtypisierung A 29%, C 55%, D 15%, G 1%). Auf individueller Ebene ist eine Vorhersagekraft von 71% jedoch nicht ausreichend. Die Schuld dafür ist in den extrem ähnlichen Aminosäuresequenzen der prävalenten genetischen Subtypen zu suchen, die eine Unterscheidung von A und C beziehungsweise D und C in vielen Fällen unmöglich machten. Anstelle dessen spiegeln serologische Ergebnisse die Verteilungshäufigkeit der V3-Serotypen wieder.

Um in der beschriebenen afrikanischen Region in groß angelegten Studien die genetischen HIV-1-Subtypen untersuchen zu können, sind zusätzliche oder modifizierte Algorithmen nötig, mit deren Hilfe die durch regionale Besonderheiten der Viren verursachten Schwierigkeiten der serologischen Tests erkannt und korrigiert werden können.

VII LITERATURVERZEICHNIS

1. **2. Baseline survey results.** AIDS 1995; 9: 927-34
2. **Implication of the Human Immunodeficiency Virus Variability for Transmission: Scientific and Policy Issues.** Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); 27-29 March 1996, Berlin, Germany
3. Abimiku AG, Stern TL, Zwander A, Markham PD, Calef C, Kyari S, Saxinger WC, Gallo RC, Robert-Guraff M, Reitz MS: **Subtype G HIV type 1 isolates from Nigeria.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1581-1583
4. AIDS CARE (2000), Vol. 12, No. 6: 798
5. AIDSCAP/Family Health International, Havard School of Public Health and UNAIDS (1996): **The Status and Trends of Global HIV/AIDS Pandemic** Symposium Final Report, Vancouver, 5-6 July 1996
6. Alaeus A, Leitner T, Lidman K, Albert J: **Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden.** AIDS 1997; 11: 199-202
7. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: **CC-CKR 5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.** Science 1996; 272: 1955-1958
8. Andeweg AC, Leeftang P, Osterhaus ADME, Bosch ML: **Both the V2 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation.** J Virol 1993; 67: 3232-3239
9. Arnold C, Barlow KL, Parry JV, Clewley JP: **At least five HIV-1 sequence subtypes (A, B, C, D, A/E) occur in England.** AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11: 427-429
10. Artenstein AW, Coppola J, Brown AE, Carr JK, Sanders-Buell E, Galbarini E, Mascola JR, Vancott TC, Schonbrood P, McCutchan FE, Burke DS: **Multiple introductions of HIV-1 subtype E into western hemisphere.** Lancet 1995; 346: 1197-1198
11. Asjo B, Morfeldt-Manson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidmann K, Fenyo EM: **Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection.** Lancet 1986; 2: 660-662
12. Barin F, Lahbabi Y, Buzelay L, Lejeune B, Baillou-Beaufils A, denis F, Mathiot C, M'Boup S, Vithayasai V, Dietrich U, Goudeau A: **Diversity of antibody binding to V3 peptides representing consensus sequences of HIV type 1 genotypes A to E: An approach for HIV type 1 serological subtyping.** AIDS Res Hum Retroviruses 1996; 12: 1279-1289
13. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome.** Science 1983; 220: 868-871

14. Barré-Sinoussi F: **HIV as the cause of AIDS.** Lancet 1996; 348: 31-35
15. Bergeron L, Sullivan N, Sodroski J: **Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus.** J Virol 1992; 66: 2389-2397
16. Biglino A, Sinicco A, Forno B, Pollono AM, Sciantra M, Martini C, Pich P, Gioannini P: **Serum cytokine profiles in acute primary HIV-1 infection and in infectious mononucleosis.** Clin. Immunol. Immunopathol. 78, 1 (1996) 61-69
17. Biti R, French R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T: **HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele.** Nature Med 1997; 3: 252-258
18. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB: **Virus-specific CD8+ cytotoxic activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.** J Virol 1994; 68: 6103-6110
19. Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, Weiss RA: **A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism.** J Virol 1993; 67: 3649-3652
20. Brodine SK, Mascola JR, Weiss PJ, Ito SI, Porter KR, Artenstein AW, Garland FC, McCutchan FE, Burke DS: **Detection of HIV-1 genetic subtypes in the USA.** Lancet 1995; 346: 1198-1199
21. Bruce C, Clegg C, Featherstone A, Smith J, Birya B, Downing R, Oram J: **Presence of multiple genetic subtypes of Human Immunodeficiency Virus type 1 proviruses in Uganda.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1543-1550
22. Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G, Tauer C, Steindl F, Jungbauer A, Katinger H: **Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins: electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 359-369
23. Buchacher A, Predl R, Tauer C, Purtscher M, Gruber G, Heider R, Steindl F, Trkola A, Jungbauer A, Katinger H: **Human monoclonal antibodies against gp 41 and gp 120 as potential agents for passive immunization.** Vaccines 1992; 92: 191-195
24. Bukrinsky M, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M: **A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells.** Nature 1993; 365: 666-668
25. Burton DR, Barbas CF, Persson MA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA: **A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals.** Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10134-10137
26. Cabello A, Cabral M, Vera ME, Kiefer R, Azorero RM, Eberle J, Gürtler L, von Brunn A: **Analysis of the V3 loop sequences from 10 HIV type-1-infected AIDS patients from Paraguay.** AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11: 113-137

27. Caceres CF, Hearst N: **HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean.** AIDS 1996; 10 (suppl A): S43-49
28. Cao H, Kanki P, Sankale JL, Korber B, M'Bou P, Walker BD: **CTL cross-reactivity among different HIV-1 clades: implications for vaccine development.** J Virol 1997; 71: 8615-8623
29. Centers for Disease Control: **Kaposi's Sarkoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981; 30: 305-308
30. Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guétard D, Chamaret S, Cohen J, Rémy G, Montagnier L, Clavel F: **Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group.** Virology 1994; 205: 247-253
31. Cheingsong-Popov R, Lister S, Callow D, Kaleebu P, Beddows S, Weber J and the WHO network for HIV Isolation and Characterization: **Serotyping HIV type 1 by antibody binding to the V3 loop: Relationship to viral Genotype.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1379-1386
32. Cheingsong-Popov R, Osmanov A, Pau C-P, Schochetman G, Barin F, Holmes H, Francis G, Ruppach H, Dietrich U, Lister S, Weber J, and the UNAIDS Network for HIV-1 Isolation and Characterization: **Serotyping of HIV Type 1 Infections: Definition, Relationship to Viral Genetic Subtypes, and Assay Evaluation.** AIDS Res Hum Retroviruses 1998; 14: 331-318
33. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA: **Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host.** Science 1998; 240: 80-82
34. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard G, Sodroski J: **The β -chemokine receptors CCR 3 and CCR 5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.** Cell 1996; 86: 1135-1148
35. Chou CP, Hu DJ, Spurill C, Schable C, Lackritz E, Kai M, George JR, Rayfield MA, Dondero TJ, Williams AE, Busch MP, Brown AE, McCutchan FE, Schochetman G: **Surveillance for HIV-1 group O infections in the United States.** Transfusion 1996; 36: 398-400
36. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L : **Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS.** Science 1986; 233: 343-346
37. Clerici M, Giorgi JV, Chou CC, Gudeman VK, Zack JA, Gupta P, HO HN, Nishanian PG, Berzofsky JA, Shearer GM: **Cell-mediated immune response to Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1.** J Infect Dis 1992, 165: 1012-1019
38. Coffin JM: **Structure and classification of retroviruses.** In: Levy JA, ed.: The retroviridae, vol.1. New York: Plenum, 1992: 19-50
39. Cullen BR, Green WC: **Functions of the auxiliary gene products of human immunodeficiency virus type 1.** Virology 1990; 178: 1-5

40. D'Souza P, Livnat D, Bradac JA, Bridges SH, the AIDS Clinical Trials Group Antibody Selection Working Group and Collaborating Investigators: **Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralizing assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials.** *J Infect Dis* 1997; 175: 1056-1062
41. Dalgleish Ag, Beverly PCL; Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** *Nature* 1984; 312: 763-766
42. Daniel M, Kirchhoff F, Czajak S, Sehgal P, Desrosier R: **Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene.** *Science* 1992; 258:1938-1941
43. De Cock KM, Adjorlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, Brattegaard K, Vetter KM: **Epidemiology and transmission of HIV-2 - why there is not an HIV-2 pandemic.** *JAMA* 1993; 270: 2083-2086
44. De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyö EM, Rübsamen-Waigmann H, Holmes H, Galvao-Castro B, Karita E, Wasi C, Sempala SDK, Baan E, Zorgdrager F, Lukashov V, Osmanov S, Kuiken C, Cornelissen M and the WHO Network for HIV Isolation and Characterization: **Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of Human Immunodeficiency Virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1387-1400
45. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ: **Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR-5 structural gene.** *Science* 1996; 273: 1856-1862
46. DeJong JJ, DeRonde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J: **Minimal requirements for the Human Immunodeficiency Virus type 1 domain to support the Syncytium-inducing phenotype: Analysis by single amino acid substitution.** *J Virol* 1992; 66: 6777-6780
47. DeJong JJ, Goudsmit J, Keulen W, Klaver B, Krone WJA, Tersmette M, Ronde A: **Human Immunodeficiency Virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity.** *J Virol* 1992; 66: 757-765
48. Delwart EL, Herring B, Learn Jr. GH, Rodrigo AG, Mullins JI: **Heteroduplex mobility analysis HIV-1 env subtyping kit - Protocol version 3** provided by the NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm
49. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, Mullins JI: **Genetic relationship determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: Analysis of HIV-1 env genes.** *Science* 1993; 262: 1257-1261
50. Deng HK, Choe S, Ellmeier W, Liu R, Ukutmaz D, Burkhart M, DiMarzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Peiper SC Schall TJ, Littma DR, Landau NR: **Identification**

- of C-C chemokine receptor 5 as the major coreceptor for entry of macrophage-tropic Human Immunodeficiency Virus type 1.** *Nature* 1996; 381: 661-666
51. Diaz R, Sullivan M, Williams A: **Surveillance of HIV-1 subtypes in 222 US blood donors: identification of the first subtype A infection.** 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Washington, D.C., January 1996; Poster abstract 508
 52. Dittmar MT, Simmons G, Hibbitts S, O'Hare M, Louisirirothanakul S, Beddows S, Weber J, Clapham PR, Weiss RA: **Langerhans Cell Tropism of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype A through F Isolates Derived from Different Transmission Groups.** *J Virol* 1997; 71: 8008-8013
 53. Dittmar MT, Zeheng L, Kaptue L, Eberle J, Kräusslich HG, Gürtler L: **Coreceptor Requirements of Primary HIV Type 1 Group O Isolates from Cameroon.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15: 707-712
 54. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper S, Parmentier M, Collman RG, Doms RW: **A dual-tropic, primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-2b as fusion cofactors.** *Cell* 1996; 86: 1149-1159
 55. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: **β -Chemokines inhibit HIV-1 entry into CD4+ cells via the C-C CKR-5 co-receptor.** *Nature* 1996; 381: 667-673
 56. Dumitrescu O, Kalish M, Kliks SC, Bandea CI, Levy JA: **Characterization of Human Immunodeficiency Virus type 1 isolates from children in Romania: Identification of a new envelope subtype.** *J Infect Dis* 1994; 169: 281-288
 57. Engelstad M: **Genetic diversity of env V3 loop sequences in HIV type 1-infected homosexuals, heterosexuals, intravenous drug users, and haemophilia patients in Norway: high prevalence of subtype B and detection of subtype C.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 1733-1738
 58. Evans LA, McHugh TM, Stites DP, Levy JA: **Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells.** *J Immunol* 1987; 138: 3415-3418
 59. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: **HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein-coupled receptor.** *Science* 1996; 272: 872-877
 60. Fenyo EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E, Asjo B: **Distinct replication and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolate.** *J Virol* 1988; 62: 4414-4419
 61. Fenyo EM: **HIV biological phenotype varies with severity of infection across HIV-1 genetic subtypes.** In *Development and Application of Vaccines and Gene therapy in AIDS.* Basel: Karger; 1996: 49-55
 62. Ferrari G, Humphrey W, McElrath MJ, Excler JL, Duliege AM, Clements ML, Corey LC, Bolognesi DP, Weinhold KJ: **Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade**

- cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 1396-1401
63. Fickenscher H, Korn K, Schmidt B: **Virale Immundefizienz - Epidemiologie, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.** Bayerisches Ärzteblatt 2001; 4: 163-166
 64. Finzi D, Hermankova M, Pierson T Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF: **Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.** Science 1997, 278: 1295-1300
 65. Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H: **Phenotype-associated sequence variation in the third variable region of the Human Immunodeficiency Virus type 1 gp120 molecule.** J Virol 1992; 66: 3183-3187
 66. Freed ED, Delwart EL, Buchsacher GL Jr, Panganiban AT: **A mutation in the Human Immunodeficiency Virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity.** Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 70-74
 67. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Forster D, Markham PD: **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.** Science 1984; 224: 500-504
 68. Gallo RC, Sarin P, Geldmann EP: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus in acquired immunodeficiency syndrome.** Science 1983; 220: 865-67
 69. Gao F, Yue L, Hill SC, Robertson DL, Graves AH, Saag MS, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH: **HIV-1 Sequence Subtype D in the United States.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 625-627
 70. Gehring S, Maayan S, Ruppach H, Balfe H, Juraszczyk J, Yust I, Vardinon N, Rimlawi A, Polak S, Bentwich Z, Rübnsamen-Waigmann H, Dietrich U: **Molecular epidemiology of HIV in Israel.** J Acquir Immune Defic Syndr 1997; 15: 296-303
 71. Girard M, van der Ryst E, Barré-Sinoussi F, Nara P, Tartagila J, Paoletti E, Blondeau c, Jannings M, Verrier F, Meignier B, Fultz PN: **Challenge of chimpanzees immunized with a recombinant carnapox-HIV-1 virus.** Virology 1997; 232: 98-104
 72. Girard M, Yue L, Barré-Sinoussi F, vanderRyst E, Meignier B, Muchmore E, Fultz PN: **Failure of a Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) Subtype B-derived vaccine to prevent infection of Chimpanzees by an HIV-1 Subtype E strain.** J Virol 1996; 70: 8229-8233
 73. Gnaore E, De Cock K, Gayle H, Porter A, Coulibaly R, Timite M, Assi Adou J, Heyward WL: **Prevalence and mortality from HIV type 2 in Guinea Bissau, West Africa.** Lancet 1989, 2: 513
 74. Goudsmit J, Debouck C, Meloen RH, Smit L, Bakker M, Asger DM, Wolff AV, Gibbs CF Jr., Gojdusek DC: **Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in**

- experimentally infected chimpanzees.** Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 4478-4482
75. Grimaila R, Fuller BA, Rennert PD, Nelson MB, Hammarskjold M, Potts B, Murray M, Putney SD, Gray G: **Mutations in the principal neutralization determinant of Human Immunodeficiency Virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics and neutralization.** J Virol 1992; 66: 1875-1883
 76. Groenick M, Fouchier RAM, Broersen S, Baker CH, Koot M, Van'tWout AB, Huisman HG, Miedema F, Tersmette M, Schuitemaker H: **Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration.** Science 1993; 260: 1513-1516
 77. Gromyko A: **Epidemiological trends of AIDS and other Sexually Transmitted Diseases in the Eastern part of Europe.** International Conference on AIDS, Vancouver. 7-12 July 1996, Abstract Tu.C.205
 78. Grosskurth H, Mosha F, Todd J, Senkoro K, Newell J, Klokke A, Changalucha J, West B, Mayaud P, Gavyole A, Gabone R, Mabey D, Hayes R: **A community trial of the impact of improved sexually transmitted disease treatment on the HIV epidemic in rural Tanzania: ---**
 79. Gürtler L: **Diagnostik der HIV-Infektion.** HIV-Infektion - Pathogenese, Diagnostik und Therapie; Ruf B, Pohle HD, Goebel FD, L'age M (Herausgeber), SMVerlagsgesellschaft mbH, 1996
 80. Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L: **A New Subtype of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (MVP-5180) from Cameroon.** J Virol 1994, 68: 1581-1585
 81. Hahn B, Robertson D, Sharp P: **Intersubtype recombination of HIV-1 and HIV-2.** Human Retroviruses and AIDS (Myers G, Korber B: Herausg.), Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1995.
 82. Hanenberg RS, Rojanapithayakorn W, Kunasol P, Sokal DC: **Impact of Thailand's HIV-control programme as indicated by the decline of sexually transmitted diseases.** Lancet 1994; 344: 243-245
 83. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans S, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD: **Strong cytotoxic T-cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection.** AIDS Res Hum Retroviruses 1996; 12: 585-592
 84. Haseltine WA: **Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1.** FASEB J 1991; 5: 2349-2360
 85. Hayami M, Ido E, Miurat T: **Survey of simian immunodeficiency virus among non human primate populations.** Curr Top Microbiol Immunol 1994; 188: 1-20
 86. Hecht FM, Chesney MA, Busch MP, Rawal BD, Staprans SI, Kahn JO: **Treatment of primary HIV with AZT, 3TC and indinavir.** Program and abstracts of the Fifth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, February 1-5, 1998: 189.abstract

87. Hertzenbach U, Shearer GM: **Germ-cell induced immune suppression in mice.** J Exp Med 1982; 155: 1719-1729
88. Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, Carrillo MG, Russi JC, Vinales J, Alava A, Acosta ME, Gianella A, Andrade R, Sanchez JL, Carrion MG, Russell K, Robb M, Birx D, McCutchan F, Carr JK: **Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay and Argentina.** AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Dec 10 ; 18 (18) : 1339-50
89. Ho DD, Moudgie T, Alam M: **Quantitation of Human Immunodeficiency Virus type 1 in the blood of infected persons.** N Engl J Med 1989; 321: 1621-1625
90. Hoffmann C, Jäger H: **Neues bei der AIDS-Therapie.** Bayerisches Ärzteblatt 2001; 4: 167-170
91. Holm-Hansen C, Ayejunie S, Johansson B, Nkya W, Shao J, Haukenes G: **HIV-1 proviral DNA sequences of env gp41 PCR amplicates from Tanzania.** APMIS 1996; 104: 459-464
92. Hoelscher M: **Risiko von HIV-Übertragung durch Injektionen in der Mbeya Region, Tansania.** Dissertation 1996, LMU München
93. Hoelscher M, Hanker S, Barin F, Cheingsong-Popov R, Dietrich U, Jordan-Harder B, Olaleye D, Nägele E, Markuzzi A, Mwakagile D, Minja F, Weber J, Gürtler L, von Sonnenburg F: **HIV Type 1 V3 Serotyping of Tanzanian Samples: Probable Reasons for Mismatching with Genetic Subtyping.** AIDS Res Hum Retroviruses 1998; 14: 139-149
94. Hoelscher M, Kim B, Maboko L, Mhalu F, von Sonnenburg F, Birx DL, McCutchan FE; The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization: **High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania.** PMID: 11504977 [PubMed – indexed for MEDLINE]
95. Hoelscher M, Sanders-Buell E, Dowling W, Carr JK, Harris M, Thomschke A, Robb M, Birx DL, McCutchan FE: **Detection of HIV-1 subtypes, recombinants and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay.** AIDS 2002 Oct 18; 16 (15): 2055-64
96. Hu DJ, Dondero TJ, Reyfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Lou CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW: **The emerging diversity of HIV: the importance of global surveillance for diagnostics, research and prevention.** JAMA 1996; 275: 210-216
97. Hu WS, Temin HM: **Genomic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination.** Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1556-1560
98. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradimi D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA: **The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression.** Nature Med 1996; 2: 1240-1243
99. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR: **Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of all tropism in HIV-1.** Science 1991; 253: 71-74

100. Ichimura H, Kliks SC, Visrutaratna S, Ou C-Y, Kalish ML, Levy JA: **Biological, serological and genetic characterization of HIV-1 subtype E isolates from Thailand.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 263-269
101. **Immunodeficiency Virus Type 1 in rural northwest Tanzania.** AIDS Res Hum
102. Jameel S, Zaffrullah M, Ahmad M, Kapoor GS, Sehgal S: **A genetic analysis of HIV-1 from Punjab, India reveals the presence of multiple variants.** AIDS 1995; 9: 685-690
103. Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, Ndumbe PM, Delaporte E, Perret JL, Atende C, Piot P, VanderGroen G: **Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in Central Africa.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 887-897
104. Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Temmerman M, Leonaers A, Ivens T, Motte J, Piot P, van der Groen G: **Genetic variability of HIV type 1 in Kenya.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1577-1579
105. Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herliny WC, Putney SD, Matthews TJ: **Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1.** Science 1990; 250: 1590-1593
106. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Echler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, Matthews TJ: **Principal neutralizing domain of the Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein.**
107. Kaleebu P, Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Bieniasz P, Garaev M, Weber J: **Identification of HIV-1 subtype G from Uganda.** AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11: 657-659
108. Kanki PJ, Travers KU, Mboup S, Hsieh CC, Marlink RG, Gueye-NDiaye A, Siby T, Thior I, Hernandez-Avila M, Sanhale JL: **Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1.** Lancet 1994; 343: 943-946
109. Kapiga SH, Lyamuya EF, Lwihula GK, Hunter DJ: **The incidence of HIV infection among women using family planning methods in Dar es Salaam, Tanzania.** AIDS 1998, 12: 75-84
110. Karlsson A, Parsmyr K, Aperia K, Sandstrom E, Fenyo EM, Albert J: **MT-2 cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates as a marker for response to treatment and development of drug resistance.** J Infect Dis 1994; 170: 1367-1375
111. Kessler II JA, McKenna PM, Emini EA, Conley AJ: **In vitro assessment of the therapeutic potential of anti-HIV-1 monoclonal neutralizing antibodies.** General Meeting of the American Society of Microbiology 1995; 95: 586, T-25
112. Killewo JZJ, Sandstorm A, Bredberg-Raden U, Mhalu FS, Biberfeld G, Wall S: **Incidence of HIV-1 infection among adults in the Kagera region of Tanzania.** Int J Epidemiol 1993; 22: 528-536

113. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L: **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** Nature 1984; 312: 767-768
114. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof-Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftinck-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H, Miedema F: **Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics.** J Exp Med 1995; 181: 1365-1372
115. Kobyshoka Y, Scherbinskaya A, Khodekevitch L, et al: **HIV infection among drug users in Ukraine - the beginning of the epidemic.** XI International Conference on AIDS, Vancouver. 7-12 July 1996. Abstract Tu.C.204
116. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, De Goede RE, Roos MT, Coutinko RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M: **Prognostic value of human immunodeficiency virus type 1 biological phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS.** Ann Intern Med 1993; 118: 681-688
117. Koot M, Van TWout AB, Kootstra NA, DeGoede REY, Tersmette M, Schuitemaker H: **Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype and the clonal composition of virus populations in the course of Human immunodeficiency virus type 1 infection.** J Infect Dis 1996; 173: 349-354
118. Koot M, Vos AH, Keet RPM, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M: **HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay.** AIDS 1992; 6: 49-54
119. Korber BTM, MacInnes K, Smith RF, Myers G: **Mutational Trends in V3 Loop Protein Sequences Observed in Different Genetic Lineages of Human Immunodeficiency Virus Type 1.** J Virol, 1994; 68: 6730-6744
120. Korber BTM: **HIV variability and CTL epitopes.** Presented at the Workshop on HIV-1 Subtypes: Implications for Epidemiology, Pathogenicity, Vaccines and Diagnostics. Dar es Salaam, June 1997
121. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD: **Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains from Patients in Cyprus: Identification of a New Subtype Designated Subtype I.** J Virol 1995; 69: 6122-30
122. Kostrikis LG, Cao Y, Ngal H, Moore JP, Ho DD: **Quantitative Analysis of Serum Neutralization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Subtypes A, B, C, D, E, F, and I: Lack of Direct Correlation between Neutralization Serotypes and Genetic Subtypes and Evidence for Prevalent Serum-Dependent Infectivity Enhancement.** J Virol 1996; 70: 445-458
123. Kostrikis LG, Shin S, Ho DD: **Genotyping HIV-1 and HCV strains by a combinatorial DNA melting assay (COMA).** Mol Med 1998; 4: 443-453
124. Koup RM, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Brokowsky W, Farthing C, Ho DD: **Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.** J Virol 1994; 68: 4650-4655

125. Kuiken CL, Korber B: **Epidemiological significance of intra- and interperson variation of HIV-1.** AIDS 1994, 8 (suppl 1): S73-83
126. Kurth R, Binninger D, Ennen J, Denner J, Hartung S, Norley S: **The Quest for an AIDS Vaccine: The State of the Art and Current Challenges.** AIDS Res Hum Retroviruses 1991; 7: 425-433
127. Lafeuillade A, Poggi C, Tamalet C, Profizi N, Tourres C, Costes O: **Effects of a combination of zidovudine, didanosine, and lamivudine on primary human immunodeficiency virus type 1 infection.** J Infect Dis 1997; 175: 1051-1055
128. Laga M, Diallo MO, Buve A: **Inter-relationship of sexually transmitted diseases and HIV: where are we now ?** AIDS 1994; 8 (suppl 1): S199-224
129. Langedijk JPM, Zwart G, Goudsmit J, Meloen RH: **Fine specificity of antibody recognition may predict amino acid substitution in the third variable region of gp120 during HIV type 1 infection.** AIDS Res Human Retroviruses 1995; 11: 1153-1162
130. Langlade-Demoyen P, Ngo-Giang-Huong N, Ferchal F, Oksenhendler E: **Human Immunodeficiency Virus (HIV) nef-specific cytotoxic T-lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients.** J Clin Invest. 1994; 93: 1293-1297
131. Lehner T, Hussain L, Wilson j, Chapman M: **Mucosal transmission of HIV.** Nature 1991; 353: 709
132. Leitner T, Alaeus A, Marquina S, Lilja E, Lidman K, Albert J: **Yet Another Subtype of HIV Type 1 ?** AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11: 995-997
133. Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW: **Potent, protective anti-HIV immune response generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 9378-9383
134. In: Levy JA, ed. The retroviridae, vol.1. New York: Plenum, 1992: 19-50
135. Levy JA: **Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** Microbiol Rev 1993; 57: 183-289
136. Lewis MG, Elkins WR, McCutchan FE, Benveniste RE, Lai CY, Montefiori DC, Burke FS, Eddy GA, Shafferman A: **Passively transferred antibodies directed against conserved regions of SIV envelope protect macaques from SIV infection.** Vaccine 1993; 11: 1347-1355
137. Liu R, Paxton WA, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: **Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiple-exposed individuals to HIV-1 infection.** Cell 1996; 86: 367-377
138. Löscher T, Hölscher M: **Neue Impfstoffe in der Reisemedizin.** Bayerisches Ärzteblatt 2001; 3: 111-115

139. Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B, Letourner F, Gomas E, Allen E, Ly TD, Brun-Vezinet F, Simon F, Saragosti S: **Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France.** *J Virol* 1995; 69: 5640-5649
140. Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, Ingrand D, Saragosti D, Courouce AM, Brun-Vezinet F, Simon F: **HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients.** *Lancet* 1994; 343: 1393-1394
141. Louwagie J, Delward EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS: **Genetic Analysis of HIV-1 Isolates from Brazil Reveals Presence of Two Distinct Genetic Subtypes.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 561-567
142. Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G, McCutchan F, Burke DS: **Genetic diversity of the envelope glycoprotein from Human Immunodeficiency Virus type 1 isolates of African origin.** *J Virol* 1995; 69: 263-271
143. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen D, Franssen K, Gershy-Damet GM, Deleys R, Burke DS: **Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes.** *AIDS* 1993; 7: 769-780
144. Lukashov VV, Cornelissen MTE, Goudsmit J, Papuashvilli MN, Rytik PG, Khaitov RM, Karamov EV, de Wolf F: **Simultaneous introduction of distinct HIV-1 subtypes into different risk groups in Russia, Byelorussia and Lithuania.** *AIDS* 1995; 9: 435-439
145. Lukashov VV, Kuiken CL, Boer K, Goudsmit J: **HIV type 1 subtypes in The Netherlands circulating among women originating from AIDS endemic regions.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 951-953
146. Lukashov VV, Kuiken CL, Goudsmit J: **Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period.** *J Virol* 1995; 69: 6911-6916
147. Luo CC, Tian C, Hu DJ, Kai M, Dondero T, Zheng X: **HIV-Subtype C in China.** *Lancet* 1995; 345: 1051-1052
148. Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA: **Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection.** *Lancet* 1994; 344: 1671-1673
149. Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R: **The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.** *Cell* 1986; 47: 333-348
150. Mann JM, Tarantola D: **AIDS in the World II/ the AIDS Policy Coalition.** Oxford University Press, Inc. (1996)
151. Marlink R: **Lessons from the second AIDS virus, HIV-2.** *AIDS* 1996; 10: 689-699
152. Mastro TD, Kitayaporn D, Weniger BG, Vanichseni S, Laosunthorn V, Uneklabh C, Choopanya K, Limpakarnjanarat K: **Estimating the number of HIV-1 infected**

- injection drug users in Bangkok, Thailand: a capture-recapture method.** Am JK Public Health 1994; 84: 1094-99
153. Merson MH: **Slowing the spread of HIV: Agenda for the 1990s.** Science 1993; 260: 1266-68
 154. Mertens TE, Burton A: **Estimates and trends of the HIV/AIDS epidemic.** AIDS 1996; 10 (suppl A): S221-228
 155. Modrow S, Falke D: **Molekulare Virologie.** Spektrum, Akad. Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford; 1997
 156. Modrow S, Hahn B, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H: **Computer-assisted analysis of the envelope protein sequences of seven HTLV-III / LAV isolates: prediction of antigenetic epitopes in conserved and variable regions.** J Virol 1987; 61: 570-578
 157. Moore JP, Cao Y, Leu J, Qin L, Korber B, Ho DD: **Inter- and Intraclade Neutralization of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Genetic Clades Do Not Correspond to Neutralization Serotypes but Partially Correspond to gp120 Antigenic Serotypes.** J Virol 1996; 70: 427-444
 158. Moore JP, Thali M, Jameson BA, Vignaux F, Lewis GK, Poon S, Charles M, Fung S, Sun B, Durda PJ, Akerblom L, Wahren B, Ho DD, Sattentau QJ, Sodroski: **Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop.** J Virol 1993; 67: 4785-4796
 159. Mulder DW, Nunn AJ, Kamali A, Nakiyingi J, Wagner HU, Kengeya-Kayondo JF: **Two-year HIV-1-associated mortality in an Ugandan rural population.** Lancet 1994; 343: 1021-1023
 160. Mullis KB, Faloona FA: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.** In: Wu R.(Herausgeber) Methods in Enzymology. Bd. 155. San Diego: Academic Press. 1987: 335-350
 161. Murphy E, Korber B, Georges-Coubot MC, You B, Pinter A, Cook D, Kiény MP, Georges A, Mathiot C, Barré-Sinoussi F, Girard M: **Diversity of V3 region sequences of Human Immunodeficiency Virus type 1 from Central African Republic.** AIDS Res Hum Retroviruses 1993, 9: 997-1006
 162. Myers G, Korber B, Berzofsky J, Smith RF, Pavlakis GN: **Human Retroviruses and AIDS Database.** Los Alamos National Laboratory; Los Alamos, New Mexico, 1992.
 163. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Jeang KT, Henderson LE, Pavlakis GM: **Human retroviruses and AIDS . A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.** Los Alamos National Laboratory. New Mexico.
 164. Myers G: **Tenth anniversary perspectives on AIDS: HIV: Between past and future.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10; 1317-24
 165. Nerurkar VR, Nguyen HT, Dashwood W, Hoffmann PR, Yin C, Morens DM, Kaplan AH, Detels R, Yanagihara R: **HIV type 1 subtype E in commercial sex workers and**

- injection drug users in Southern Vietnam.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 841-843
166. Neurath AR, Strick N, Lin K, Jiang S: **Multifaceted consequences of anti-gp41 monoclonal antibody 2F5 binding to HIV type 1 virions.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 687-696
 167. Ng'weshemi JZL, Boerma JT, Pool R, Barongo L, Senkoro K, Maswe M, Isingo R, Schapink D, Nnko S, Borgdorff MW: **Changes in male sexual behaviour in response to the AIDS epidemic: evidence from a cohort study in urban Tanzania.** *AIDS* 1996; 10: 1415-20
 168. Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Ndumbe PM, Motte J, Leonaers A, Ngalle M, Ayuk J, Piot P, van der Groen G: **Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon.** *AIDS* 1994; 8: 1405-1412
 169. Nye KE, Parkin JM: **HIV und AIDS: die molekularbiologischen Grundlagen.** Spektrum Akad. Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford; 1995
 170. O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC 2nd: **HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32 [letter].** *Lancet* 1997; 349: 1219
 171. Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, Lou CC, Kalish ML, Auwanit W, Yamazaki S, Gayle HD, Young NL, Schochetman G: **Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into high-risk populations in Thailand.** *Lancet* 1993; 341: 1171-1174
 172. Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Randall RR, Bolognesi DP, Haynes BF: **Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1932-1936
 173. Parren PWHI, Ditzel HJ, Gulizia RJ, Binley JM, Barbas CF 3rd, Burton DR, Masier DE: **Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site.** *AIDS* 1995; 9: F1-F6
 174. Pau C-P, Kai M, Holloman-Candal DL, Luo C-C, Kalish ML, Schochetman G, Byers B, George JR, and the WHO Network for Isolation and Characterization: **Antigenetic Variation and Serotyping of HIV Type 1 from four World Health Organization-Sponsored HIV Vaccine Sites.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1369-1377
 175. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Shurnick J, Van-Devanter NL, Padian N, Braun JF, Katler DP, Walinsky SM, Kroup RA: **Restrictive resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual-exposure.** *Nat. Med.* 1996; 2: 412-417
 176. Perrin L, Markowitz M, Calandra G, Chung M, MRL Acute HIV Infection Study Group: **An open treatment study of acute HIV infection with zidovudine, lamivudine and indinavir sulfate.** Program and abstracts of the Fourth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington, D.C., January 22-26, 1997: 108.abstract

177. Pfulzner A, Dietrich U, von Eichel U, von Breisen H, Brede HD, Maniar JK, RübSamen-Waigmann H: **HIV-1 and HIV-2 infections in a high risk population in Bombay, India: evidence for the spread of HIV-2 and presence of divergent HIV-1 subtypes.** J Acquir Immune Defic Syndr 1992; 5: 972-977
178. Pinto LA, Sullivan J, Berzofsky JA, Clerici M, Kessler MA, Landay AL, Shearer GM: **Env-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids.** J Clin Invest 1995; 96: 867-876
179. Pokrovski VV, Eramova IU, Deulina MO, Lipetikov VV, Iashkulov KB, Sliusareva LA, Chemizova NM, Sachenko SP: **Outbreak of hospital infection caused by Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Elista.** Zh Microbiol Epidemiol Immunol (in Russian) 1990; 4: 17-23
180. Pontesilli O, Klein MR, Kerkhof-Garde SR, Pakker NG, de Wolf F, Schuitemaker H, Miedema F: **Kinetics of immune functions and virus replication during HIV-1 infection.** Immunol Lett 1997; 57: 125-130
181. Pope M, Frankel SS, Mascola JR, Trkola A, Isdell F, Brix DL, Burke DS, Ho DD, Moore JP: **HIV-1 strains from subtype B and E replicate in cutaneous dendritic cell mixtures without displaying subtype-specific tropism.** J Virol 1997; 71: 8001-8007
182. Potts KE, Kalish ML, Bandea CI, Orloff GM, St. Louis M,, Brown C, Malanda C, Kavuka M, Schochetman G, Ou C, Heyward WL: **Genetic diversity of Human Immunodeficiency Virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire.** AIDS Res Hum Retroviruses 1993; 9: 613-618
183. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA: **Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.** Science 1988; 242: 1168-1171
184. Quinn TC: **Global burden of the HIV pandemic.** Lancet 1996; 348: 99-106
185. Rayfield MA, Sullivan P, Bandea CI, Britvan L, Otten RA, Pau CP, Pieniazek D, Subbaro S, Simon P, Schable CA, Wright AC, Ward J, Schochetman G: **HIV-1 group O identified for the first time in the United States.** MMWR 1996; 45: 561-564
186. Renjifo B, Chaplin B, Mwakagile D, Shah P, Vannberg F, Msamanga G, Hunter D, Fawzi W, Essex M: **Epidemic Expansion of HIV Type 1 Subtype C and Recombinant Genotypes in Tanzania.** AIDS Res Hum Retroviruses 1998; 14: 635-638
187. Retroviruses 1996; 12: 1389-1391
188. Robbins KE, Bandea CI, Levin A, Goedert J, Blattner WA, Brubaker G, Brown TM, Schochetman G, Kalsish ML, Shao J, O'Brien TR: **Genetic variability of human immunodeficiency virus type 1 in rural northwest Tanzania.** AIDS Res Hum Retroviruses 1996; 12: 1389-1391
189. Robbins KE, Kostrikis LG, Brown TM, Anzala O, Shin S, Plummer FA, Kalish ML: **Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains in Kenya: A Comparison Using Phylogenetic Analysis and a Combinatorial Melting Assay.** AIDS Res Human Retroviruses 1999; 15: 329-335

190. Robert-Koch-Institut: **Gegenwärtiger Stand und Entwicklung der globalen HIV/AIDS-Epidemie.**
191. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA: **The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.** Science 1988; 242: 1171-1173
192. Rosenberg E, Billingsley J, Caliendo A: **Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.** Science 1997; 278: 1447-1450
193. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, Whitby D, Sabally S, Gallimore A, Corrah T: **HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women.** Nat. Med, 1995; 1: 59-64
194. Rübsamen-Waigmann H, Briesen HV, Maniar JK, Rao PK, Scholz C, Pflutzner A: **Spread of HIV-2 in India.** Lancet 1994; 337: 550-551
195. Rübsamen-Waigmann H, vonBriesen H, Holmes H, Björndal A, Korber B, Esser R, Ranjbar S, Tomlinson P, Galvano-Castro B, Karita E, Sempala S, Wasi C, Osmanov S, Fenyö EM, WHO network for HIV isolation and characterization: **Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10: 1401-1408
196. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber B, Diaz RS, Bongertz V, Calvalcante S, Gálvao-Castro B, Mullins JI, Mayer A: **Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil.** J Virol 1994; 68: 6340-6346
197. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: **Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** Science 1988; 239: 487-491
198. Sattentau QJ, Moore JP: **Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer.** J Exp Med 1995; 182: 185-196
199. Schedel I: **Pathogenese der HIV-Erkrankung.** HIV-Infektion - Pathogenese, Diagnostik und Therapie; Ruf B, Pohle HD, Goebel FD, L'age M (Herausgeber), SMVerlagsgesellschaft mbH, 1996
200. Schmutzhard E, Fuchs D, Hengster P, Hausen A, Hifbauer J, Pohl P, Rainer J, Reibnegger G, Tibyampansha D, Werner E, Dierich MP, Gerstenbrand F, Wachter H: **Retroviral infections (HIV-1, HIV-2, and HTLV-1) in rural northwestern Tanzania.** Am J Epidemiol 1989; 130: 309-318
201. Schuitemaker H, Miedema F: **Viral and cellular determinants of HIV-1 replication in macrophages.** AIDS 1996; 10 (suppl A). S25-32
202. Sewankambo NK, Wawer MJ, Gray RH, Ronald HG, Serwadda D, Li C, Stallings RY, Musgrave SD, Konde-Lule J: **Demographic impact of HIV infection in rural Rakai district, Uganda: results of a population based cohort study.** AIDS 1994; 8: 1707-1713

203. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winklestein W: **The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels.** AIDS 1993, 7: 1159-1166
204. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C: **Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect T-cell-line and macrophage tropism of Human Immunodeficiency Virus type 1.** Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:9434-9438
205. Shioda T, Oka S, Nagai Y: **In vivo sequence changes of HIV-1 envelope V2 and V3 loops.** Leukemia 1997; 11: 187-193
206. Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vezinet F: **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.** Nature Med 1998; 4: 1032-1037
207. Siwka W, Schwinn A, Baczko K, Pardowitz I, Mhalu F, Shao J, Rethwilm A, ter Meulen V: **vpu and env sequence variability of HIV-1 isolates from Tanzania.** AIDS Res Human Retroviruses 1994; 12: 1753-1754
208. Smallman M, Cliff A: **The spread of Human Immunodeficiency Virus type 2 into Europe: a geographical analysis.** Int J Epidemiol 1991; 20: 480-489
209. Soriano V, Gutteriez M, Garcia-Lerma G, Aguilera O, Mas AA, Bravo R, Perez-Labad ML, Baquero M, Gonzalez-Lahoz J: **First case of group O infection in Spain [letter].** Vox Sang 1996; 71:66
210. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, Wasi C, Vithayasai P, Vithayasai V, Apichartpiyakul C, Auewarakul P, Pena-Cruz V, Chui D, Osathanondh R, Mayer K, Lee T, Essex M : **HIV-1 Langerhans' Cell Tropism Associated with Heterosexual Transmission of HIV.** Science, Vol.271, 1996, 1291-1293
211. Stahl-Hennig C, Coulibaly C, Petry H, Voss G, Dittmer U, Bodemer W, Makoschey B, Jurkiewicz E, Luke W, Hunsmann G: **Immunization with virion-derived glycoprotein 130 from HIV-2 or SIV protects macaques against challenge virus grown in human or simian cells or prepared ex vivo.** AIDS Res Hum Retroviruses 1994; 10 (suppl 2): S27-S32
212. Subbarao S, Schochetman G: Genetic variability of HIV-1. AIDS 1996; 10 (suppl A): S13-23
213. Tersmette M, DeGoede REY, Al BJ, Winkel I, Gruters B, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F: **Differential syncytium-inducing capacity of Human Immunodeficiency Virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and AIDS-related complex.** J Virol 1988; 62: 2026-2032
214. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Groede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F: **Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates.** J Virol 1989; 63: 2118-2125

215. Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama O, Rouzioux C: **HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32**. *Lancet* 1997; 349: 1219-1220
216. Travers K, Mboup S, Marlink R, Gueye-Ndiaye A, Siby T, Thior I, Traore I, Dieng-Sarr A, Sankale JL, Mullins C, Ndoye I, Hsieh CC, Essex M, Kanki P: **HIV-2 provides natural protection against HIV-1 infection**. *Science* 1995; 330: 209-210
217. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M: **Near-Full-Length Genome Sequencing of Divergent African HIV Type 1 Subtype F Viruses Leads to the Identification of a New HIV Type 1 Subtype Designated K**. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 139-151
218. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binkley Jm, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP: **CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5**. *Nature* 1996; 384: 184-187
219. Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD: **Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG**. *J Virol* 1995; 69: 6609-6617
220. Tscherning C, Alaeus A, Fredriksson R, Björndal A, Deng H, Littmann DR, Fenyo EM, Albert J: **Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1**. *Virology* 1998; 241: 181-188
221. UNAIDS/WHO **Epidemiological Fact Sheet**, 2000 Update - United Republic of Tanzania
222. UNAIDS/WHO **Weekly Epidemiological Record**, No 48, Dec.2000
223. Urassa M, Todd J, Boerma JT, Hayes R, Isingo R: **Male circumcision and susceptibility to HIV infection among men in Tanzania**. *AIDS* 1997; 11: 73-80
224. Van de Peer Y, DeWachter R: **TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment**. *Comput Appl Biosci* 1993; 9: 177-182
225. Van de Perre P: **The epidemiology of HIV infection and AIDS in Africa**. *Trends in Microbiology* 1995; 3: 217-222
226. Van den Haesevelde M, de Court JL, de Leys RJ, Van der Groen G: **Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate**. *J Virol* 1994; 68: 1586-1596
227. van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rvbicki EP, Williamson A-L, Williamson C: **An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Capr Town, South Africa**. *AIDS* 1997; 11: 81-87
228. VanCott TC, Bethke FR, Artenstein AW, McCutchan FE, McNeil JG, Mascola JR, Redfield RR, Birx DL: **Serotyping international HIV-1 isolates by V3 peptides and whole gp160 proteins using BIAcore**. *Methods*, 1994;6: 188-198

229. von Briesen H, Andreesen R, Rübsamen-Waigmann H: **Systematic classification of HIV biological subtypes on lymphocytes and monocytes / macrophages.** *Virology* 1990; 178: 597-602
230. Wang N, Zhu T, Ho DD: **Sequence diversity of V1 and V2 domains of gp120 from human immunodeficiency virus type 1: lack of correlation with viral phenotype.** *J Virol* 1995; 69: 2708-2715
231. Warren QR, Nkya WMMM, Shao JF, Anderson SE, Wolf H, Hendrix CW, Kanda P, Wabuke M, Boswell RN, Redfield RR, Kennedy RC: **Comparison of antibody reactivity to Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) gp160 epitopes in sera from HIV-1-infected individuals from Tanzania and from the United States.** *J Clin Microbiol* 1992; 30: 126-131
232. Warren RQ, Anderson SE, Nkya WMMM, Shao JF, Hendrix CW, Melcher GP, Redfield RR, Kennedy RC: **Examination of sera from Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)-infected individuals for antibodies reactive with peptides corresponding to the principal neutralizing determinant of HIV-1 gp120 and for in vitro neutralizing activity.** *J Virol* 1992; 66: 5210-5215
233. Warren RQ, Nkya WMMM, Shao JF, Anderson SA, Wolf H, Hendrix CW, Kanda P, Wabuke M, Boswell RN, Redfield RR, Kennedy RC: **Comparison of Antibody Reactivity to Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) gp160 Epitopes in Sera from HIV-1-Infected Individuals from Tanzania and from the United States.** *J Clin Microbiol* 1992; 30: 126-131
234. Weinstein KI, Ngallaba S, Cross AR, Mburu FM: **Tanzania Knowledge, Attitudes and Practises Survey 1994.** Calverton: Macro International Inc.; 1994
235. Weniger BG, Limpakarnjanarat K, Ungchusak K, Thanprasertsuk S, Chaopanya K, Vanichseni S, Uneklabh T, Thongcharoen P, Wasi C: **The epidemiology of HIV infection and AIDS in Thailand.** *AIDS* 1991; 5 (suppl 2): S71-85
236. Weniger BG, Takebe Y, Cu CY, Yamazaki S: **The molecular epidemiology of HIV in Asia.** *AIDS* 1994; 8 (suppl 2): S13-28
237. WHO network for Isolation and Characterization: **HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1327-1343
238. WHO: **An overview of selected curable sexually transmitted diseases.** Geneva: WHO Global Programme on AIDS, 1995
239. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richmann DD: **Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia.** *Science* 1997, 278: 1291-1295
240. Workshop Report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: **HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics.** *AIDS* 1997; 11: UNAIDS17-UNAIDS37

241. Zeheng L, Gürtler L, Afane Ze E, Sam-Abbenyi A, Mbouni-Essomba G, Mpoudi-Ngolle E, Mamy-Lobe M, Tapka JB, Kaptue L: **Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: Preliminary results.** AIDS 1994; 8: 1626-1628
242. Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho DD: **HIV-1 subtype and second receptor use.** Nature 1996, 383: 768
243. Zhong P, Peeters M, Janssens W, Franssen K, Heyndrickx L, Vanham G, Willems B, Piot P, van der Groen G: **Correlation between genetic and biological properties of biologically cloned HIV type 1 viruses representing subtypes A, B and D.** AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11: 239-248
244. Zwart G, Wolfs TFW, Bookelman R, Hartman S, Bakker M, Boucher CAB, Kuiken C, Goudsmit J: **Greater diversity of the HIV-1 V3 neutralization domain in Tanzania compared with The Netherlands: serological and genetic analysis.** AIDS 1993; 7: 467-474

Lebenslauf

Am 05. November 1970 wurde ich als Tochter des technischen Angestellten Otto Hanker und seiner Frau Brigitte in Rosenheim geboren. Meine 13-jährige Schulzeit beendete ich 1989 mit dem Abitur am neusprachlichen Zweig des Karolinengymnasiums. Zum Wintersemester 1989/90 begann ich das Studium der Ägyptologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, welches ich jedoch vor dem zweiten Semester abbrach. Anstatt dessen absolvierte ich ab Juli 1990 die einjährige Ausbildung zur Krankenpflegehelferin im Bezirkskrankenhaus Gabersee. Nach zwei Jahren Vollzeit-Berufstätigkeit wechselte ich für drei Jahre als Teilzeitangestellte in den Nachtdienst und begann gleichzeitig das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München zum Sommersemester 1993. Nach der Ärztlichen Vorprüfung wechselte ich an die Technische Universität, München. Am 12. Mai 1999 beendete ich das Studium der Medizin mit dem Dritten Staatsexamen und ging daraufhin für die Zeit als Ärztin im Praktikum an die chirurgische Abteilung des Kreiskrankenhauses Alt-/ Neuötting. Seit dem 08.01.2000 bin ich beim Werkärztlichen Dienst der Wacker Chemie GmbH in Burghausen angestellt und befinde mich in Weiterbildung zur Fachärztin für Arbeitsmedizin.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Hölscher bedanken, der mir den inhaltlich-medizinisch Part, die erforderlichen technischen Abläufe und generell die wissenschaftliche Denkweise in äußerst freundschaftlicher Art nähergebracht hat. Seine Begeisterung für das Thema und sein professionelles Arbeiten waren Vorbild und Ansporn für meine eigene Tätigkeit. Ohne seine Unterstützung, Motivation und Hilfestellung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Mein Dank gilt vor allem auch Herrn Prof. Dr. L. Gürtler und dem Team der Medizinisch-Technischen-Assistentinnen des HIV-Labors des Max-von-Pettenkoferinstituts – sie alle brachten mir während des praktischen Teils großes Vertrauen entgegen, ließen mich frei in ihrem Institut gewähren und nahmen sehr viel Rücksicht auf meine Arbeitsabläufe.

Herrn Dr. von Sonnenburg danke ich für die Möglichkeit, an einer Dissertation arbeiten zu können, bei der ich nicht nur Kenntnisse über immunologische und epidemiologische Arbeitsweisen erwerben konnte, sondern auch mit einem großartigen Team zusammenarbeiten durfte, das sich leidenschaftlich mit einer der beeindruckendsten Infektionserkrankungen überhaupt auseinandersetzt.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Andrea Gasper, Fa. Hexal AG, für ihre unermüdliche Unterstützung und nützlichen Anregungen bezüglich therapeutischer Fragestellungen.

Nicht zuletzt danke ich auch ganz besonders meinen Eltern für die stetige Motivation und Unterstützung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit.

