
Untersuchungen zu Affinitätsbindungsverfahren für HIV

Markus Opgen-Rhein



München 2009

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Lehrstuhl Virologie
Vorstand: Prof. Dr. U. Koszinowski

Untersuchungen zu Affinitätsbindungsverfahren für HIV

Dissertation

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

Vorgelegt von
Markus Opgen-Rhein
aus München, 2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rika Draenert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen: Humanes Immundefizienzvirus (HIV)	3
2.1	Aufbau und Struktur	3
2.2	Genomischer Aufbau	3
2.3	Replikationszyklus von HIV	5
2.4	HIV und Komplement	5
2.4.1	Das Komplementsystem	5
2.4.2	HIV und Komplement	7
2.5	HIV und der Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA) Klasse 2	7
2.5.1	HLA 2	7
2.5.2	HIV und HLA 2	8
2.6	HIV Therapie	9
2.6.1	Hemmstoffe der RT	10
2.6.1.1	Nukleosidische RT-Inhibitoren (NRTI)	10
2.6.1.2	Nicht-Nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTI)	10
2.6.2	Resistenzentwicklung gegenüber antiretroviraler Medikation	10
2.7	HIV Diagnostik	11
2.7.1	Antikörpernachweismethoden	11
2.7.2	Virusnachweismethoden	11
2.7.3	Diagnostische Lücke	12
2.7.4	HIV Resistenztestung	12
2.7.4.1	Genotypische Resistenztestung	12
2.7.4.2	Phänotypische Resistenztestung	13
2.8	Messung der enzymatischen RT-Aktivität	13
2.9	Messung der RT-Aktivität aus Patientenmaterial	14
2.9.1	Störfaktoren der RT-Aktivität in Patientenmaterial	14
2.9.2	Anzucht von HIV in der Zellkultur	15
2.9.3	Anreicherung von HIV durch Ultrazentrifugation	15
2.9.4	Anreicherung von HIV durch Affinitätsbindung	16
2.10	Zielsetzung der Doktorarbeit	16
3	Material und Methoden	19
3.1	PERT-Assay	19
3.2	RT-Schritt des PERT-Assays	20

3.2.1	Quellen für RT	20
3.2.1.1	HIV-1 Dauerkultur	20
3.2.1.2	Patientenmaterial	20
3.2.1.3	Rekombinante HIV RT	20
3.2.2	Reaktionsbedingungen der reversen Transkription	21
3.3	PCR-Schritt des PERT-Assays	21
3.3.1	Dekontaminations-Strategien der PCR im PERT-Assay	23
3.3.2	Verwendete Reaktionsbedingungen und und PCR-Protokolle	24
3.3.3	Nachweis der PCR-Produkte	24
3.3.3.1	Agarosegel-Elektrophorese	27
3.3.3.2	Quantifizierung von PCR-Produkten	27
3.4	Affinitätsbindungsverfahren	29
3.4.1	Raji-Zellmembran Assay	30
3.4.1.1	Anzüchtung der Raji-Zellen und Präparation der Raji-Zellmembranen	30
3.4.1.2	Affinitätsbindung an Raji Zellmembranen	32
3.4.2	Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay	33
3.4.2.1	Vorbereitung der Proben	34
3.4.2.2	Präparation der Protein A Agarose	34
3.4.2.3	Affinitätsbindung an Protein-A Agarose über C3d Antikörper	34
3.4.3	Anti-HLA-DR Bindungsassay	35
3.4.3.1	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials	36
3.4.3.2	Präparation der festen Phase: Dynabeads Pan Mouse IgG	37
3.4.3.3	Affinitätsbindung von HIV über Antikörper Anti-HLA-DR	37
3.4.4	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay	38
3.4.4.1	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials	40
3.4.4.2	Präparation der festen Phase Dynabeads Pan Mouse IgG	41
3.4.4.3	Affinitätsbindung von HIV über Antikörper Anti-HLA-DR +DP+DQ	41
4	Ergebnisse	45
4.1	Raji-Zellmembran Assay	45
4.1.1	Qualitativer Nachweis von RT-Aktivität	45
4.1.2	Raji-Zellmembranen und endogene RT-Aktivität	45
4.2	Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay	46
4.2.1	Qualitativer Nachweis von RT-Aktivität	46
4.2.2	Bestimmung der Sensitivität: MvP 899 und Human Complement Serum	46
4.2.3	Bestimmung der Sensitivität: MvP 899 in unterschiedlichen Trägermedien	48
4.2.4	Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenplasma	48
4.3	Anti-HLA-DR Bindungsassay	51

4.3.1	Anti-HLA-DR Bindungsassay mit Protein-A Agarose	51
4.3.2	Anti-HLA-DR Bindungsassay: Dynabeads Pan Mouse IgG als feste Phase	51
4.3.2.1	Nachweisgrenze ohne Plasmahemmstoffe des PERT-Assays	51
4.4	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay	53
4.4.1	Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma	53
4.4.2	Nachweis von RT-Aktivität in HIV negativen Serum	53
4.4.3	Nachweis von RT-Aktivität im Blut HIV-positiver Patienten	56
4.4.3.1	Nachweis von RT-Aktivität im Plasma HIV-positiver Patienten	56
4.4.3.2	Nachweis von RT-Aktivität im Serum HIV-positiver Patienten	56
4.4.4	Optimierungsversuche	57
4.4.4.1	Optimierung der Antigen-Antikörper Inkubationszeit im Bindungsschritt des Anti-HLA-DR+DP+DQ- Bindungsassays	57
4.4.4.2	Optimierung der Waschschrte im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay	60
4.4.5	Vergleich Affinitätsbindungs- versus Verdünnungsverfahren	61
4.4.5.1	MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum: Verhältnis 1:9	62
4.4.5.2	MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1:9	62
4.4.5.3	MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum: Verhältnis 9:1	65
4.4.5.4	MvP-899 Zellkulturüberstand in „heat inactivated Serum“: Verhältnis 1:9	65
4.4.6	Betrachtung der RT-Aktivität in verschiedenen Trägermedien	68
5	Diskussion	71
5.1	Einschränkungen des PERT-Assays: Nachweis von RT-Aktivität im Blutplasma	71
5.2	Entworfenene und Getestete Verfahren zur Affintätsbindung	71
5.2.1	Raji-Zellmembran Assay	71
5.2.2	Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay	72
5.2.2.1	HIV Zellkulturüberstand in verschiedenen Trägermedien	72
5.2.2.2	Nachweis von RT-Aktivität in Patientenplasma	73
5.2.2.3	Einschränkungen des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays	73
5.2.3	Anti-HLA-DR Bindungsassay	74
5.2.3.1	Aufreinigung von MvP 899 Zellkulturüberstand in Abwesenheit von Plasmahemmstoffen	74
5.2.4	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay	75

5.2.4.1	RT-Aktivität in HIV negativem Serum	75
5.2.4.2	Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial	76
5.2.4.3	Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnung von Inhi- bitoren des PERT-Assays	77
6	Zusammenfassung	87
	Anhang	89
A.1	Materialverzeichnis	89
A.2	Abkürzungsverzeichnis	90
	Literaturverzeichnis	91

Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktureller Aufbau von HIV	4
2.2	Genomischer Aufbau von HIV	4
2.3	HIV Replikationszyklus	6
2.4	Tertiärstruktur von HLA 1 und HLA 2	8
2.5	Mechanismus der Antigenpräsentation auf HLA Klasse 2 Proteinen	9
4.1	Agarosegel-Elektrophorese; qualitativer Nachweis von RT-Aktivität mit Raji-Zellmembranassay; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays: Pk 101 bp	46
4.2	Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp, Viruslast 15.000 Viren	47
4.3	Agarosegel Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität des Verfahrens in Human Complement Serum; Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	48
4.4	Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität des Verfahrens in verschiedenen Trägermedien; Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	49
4.5	Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: spezifisches PCR-Produkt des PERT- Assays Pk 101 bp aus Patientenmaterial	51
4.6	Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR Bindungsassay: Protein-A Agarose als feste Phase, Bestimmung der Sensitivität in 0,9% NaCl, spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	52
4.7	Agarosegel-Elektrophorese Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	54
4.8	Anti-HLA DR+DP+DQ Bindungsassay: Eichkurve anhand des CT in HIV negativen Serum	55
4.9	Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung von RT-Aktivität im Plasma HIV positiver Patienten; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	57
4.10	Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität in Serum/Plasma HIV positiver Patienten; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp	58

4.11	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 1:9	63
4.12	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1:9	64
4.13	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9:1	66
4.14	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in „heat inactivated“ Serum Verhältnis 1:9	67
4.15	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich der RT-Aktivität anhand des CT in R10-Puffer, in HIV negativem Serum, in HIV positivem Plasma	69
5.1	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 1:9	78
5.2	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9:1	81
5.3	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1:9	82
5.4	Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in „heat inactivated Serum“ Verhältnis 1:9	84
5.5	Graphische Darstellung des CT der einzelnen Verdünnungsstufen in R10-Puffer (gelber Graph), in HIV negativem Serum (blauer Graph) und HIV positiven Plasma (roter Graph).	85

Tabellenverzeichnis

3.1	Reaktionspuffer (R10-Puffer) mit optimierten Elektrolytkonzentrationen für den RT-Schritt des PERT-Assays: 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer (5R10M10T)	20
3.2	Reaktionsbedingungen für den RT-Schritt des PERT-Assays	21
3.3	Zusammensetzung der Primer/Template Mischung im RT-Schritt des PERT-Assays	21
3.4	Zusammensetzung des Nukleotid-Mix im RT-Schritt des PERT-Assays für 100 μ l Lösung	22
3.5	Reaktionsansatz des RT-Schrittes des PERT-Assays für 100 μ l eingesetztes Volumen (Reaktionsansatz für nachfolgende PCR und separates Ausleseverfahren)	22
3.6	Reaktionsansatz des RT-Schrittes des PERT-Assays für 30 μ l eingesetztes Volumen (Reaktionsansatz für nachfolgenden Real Time PCR)	22
3.7	Nukleotidsequenz des verwendeten RT-Primers: RT3529	22
3.8	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes des konventionellen PCR-Schrittes im PERT-Assay (50 μ l Reaktionsansatz)	24
3.9	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Real Time PCR im PERT-Assay (20 μ l Reaktionsansatz)	25
3.10	Protokoll: Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR des PERT-Assays	25
3.11	Protokoll: Reaktionsbedingungen der Real Time PCR des PERT-Assays	26
3.12	Verwendete PCR-Primer und Sonden	26
3.13	PCR-Produkte des PERT-Assays	27
3.14	Zusammensetzung des bei der Endpunktbestimmung verwendeten Waschpuffers (10-fach konzentriert)	28
3.15	Reaktionsablaufs zur Endpunktsbestimmung im PERT-Assay	28
3.16	DNA-Sequenz des in der Real Time PCR verwendeten Molekular Beacon	29
3.17	Zusammensetzung des Anzuchtmediums für Raji-Zellen	31
3.18	Zusammensetzung des hypotonen Puffers pH 7,9 für die Raji-Zellmembranpräparation nach der „syringe method“	31
3.19	Ablaufprotokoll des Raji-Zellmembranassays	32
3.20	Zusammensetzung des Waschpuffers im Raji-Zellmembranassay: 5R10-Puffer (R10-Puffer 5fach konzentriert)	33
3.21	Zusammensetzung der Proben für den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay	34

3.22	Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Protein-A Agarose	35
3.23	Verdünnungsreihe von MVP 899-Überstand in 0,9% NaCl	36
3.24	Zusammensetzung PBS+0,1% BSA-Puffer pH 7,4	37
3.25	Protokoll: Waschung der Dynabeads Pan Mouse IgG vor und nach Antikörperbindung	38
3.26	Protokoll: Antikörperbindung an Dynabeads Pan Mouse IgG	38
3.27	Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Dynabeads Pan Mouse IgG im Anti-HLA-DR Bindungsassay	39
3.28	Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in R10-Puffer	40
3.29	Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in HIV negativem Serum	40
3.30	Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in HIV positivem Plasma	41
3.31	Protokoll: Antikörperbindung an Dynabeads Pan Mouse IgG	42
3.32	Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Dynabeads Pan Mouse IgG im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay	43
4.1	Verdünnungsreihe der Proben in 0,9% NaCl Lösung, Darstellung der Viruslast, der in Komplement-Agarose-Bindungsassay eingebrachten Proben	49
4.2	Real Time PCR Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Vermessung von Patientenmaterial auf RT-Aktivität	50
4.3	Real Time PCR Anti-HLA-DR Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität in 0,9% NaCl, Darstellung des CT	52
4.4	Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma	53
4.5	Real Time PCR Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität in HIV negativen Serum durch Messung des CT	55
4.6	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung von RT-Aktivität im Plasma HIV positiver Patienten	56
4.7	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität in Serum/Plasma HIV positiver Patienten	58
4.8	Optimierungsversuch Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Variation der Antigen-Antikörper Inkubationszeit	59
4.9	Optimierungsversuch Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: CT in Abhängigkeit der Anzahl der Waschschritte	60
4.10	Ansatz 1: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay; Verdünnungsreihe der Proben nach Durchlaufen des Affinitätsbindungsverfahrens in R10-Puffer	61
4.11	Ansatz 2: „Herausverdünnen der Hemmstoffe“; Verdünnungsreihe der Proben in R10-Puffer	62
4.12	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 1 : 9	63
4.13	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Plasmahemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1 : 9	64

4.14	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9:1	66
4.15	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in ‘heat inactivated‘ Serum Verhältnis 1:9	67
4.16	Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität anhand des CT in R10-Puffer, in HIV negativem Serum, in HIV positivem Plasma	69

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde nach neuen Methoden gesucht, HIV aus Blutplasma HIV positiver Patienten an einer Oberfläche zu immobilisieren, um die RT-Aktivität des Virus mit einem etablierten Testverfahren (PERT-Assay) zu messen.

Mit dem hier verwendeten Verfahren zur Aktivitätsmessung der RT (PERT-Assay) war es bislang nicht möglich die RT-Aktivität des Virus direkt aus Patientenmaterial zu bestimmen. Ursächlich hierfür waren unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe der RT. Es erschien also nötig diese Plasmahemmstoffe aus dem Reaktionsansatz des PERT-Assays zu entfernen bzw. zu reduzieren, um so eine Aktivitätsmessung des Enzyms zu ermöglichen. Die Messung der enzymatischen Aktivität der RT kann unter anderem für phänotypische Resistenztestungen genutzt werden und so die Planung individueller Therapieregime gegen HIV erleichtern.

Die zum Zeitpunkt dieser Forschungsarbeit bestehenden Verfahren zur Anreicherung von HIV aus Blutplasma z. B. Ultrazentrifugation waren für die klinische Routinediagnostik aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und der Kosten nicht geeignet. Die, in dieser Dissertation entwickelten und getesteten Affinitätsbindungsverfahren für HIV sollten die Grundlage schaffen, die RT-Aktivität des Virus in Zukunft innerhalb weniger Tage direkt aus dem Plasma HIV positiver Patienten zu vermessen.

Im Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen des Virus vorgestellt, besonderes Augenmerk wird hierbei auf mögliche Zielstrukturen für ein Affinitätsbindungsverfahren (Komplement und HLA 2) gelegt. Zusätzlich wird auf diagnostische und therapeutische Probleme von HIV eingegangen, zu deren Verbesserung diese Arbeit in Zukunft vielleicht einen Teil beitragen kann.

Im Kapitel 3 werden die Methoden erläutert, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden und diejenigen, die dieser Arbeit zugrunde liegen. Im Kapitel 4 werden die Ergebnisse der einzelnen Methoden vorgestellt und im Kapitel 5 eingehend diskutiert. Im Kapitel 6 werden die wesentlichen Erkenntnisse nochmalig kurz zusammengefasst.

2 Grundlagen: Humanes Immundefizienzvirus (HIV)

1981 wurden in den USA eine Reihe von Patienten beobachtet, die unter multiplen Infektionskrankheiten, sowie gehäuft unter dem Kaposi Sarkom litten. 1982 wurde dieser Symptomenkomplex als AIDS „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ zusammengefaßt. 1983 wurde der Erreger dieser Erkrankung identifiziert. 1986 wurde der Erreger offiziell als HIV „Humanes Immundefizienzvirus“ benannt. Im Jahr 2007 sind weltweit ca. 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert (UNAIDS, 2008, S. 32).

2.1 Aufbau und Struktur

HIV ist ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Der Virusdurchmesser beträgt ca. 100-120 nm. Das Virus ist von einer Lipoproteinhülle umgeben. Diese Hüllmembran stammt von der Wirtszelle, aus der das Virus durch „budding“ freigesetzt wird. In der Lipoproteinhülle sind die Glykoproteine von HIV, gp120 und gp41, eingebettet. Gp41 ist ein Transmembranprotein, gp120 ist nicht kovalent mit gp41 verbunden. Daneben finden sich in der Virushülle eine Reihe von Proteinen, die aus der Cytoplasmamembran der Wirtszelle stammen (z. B. HLA-DR, ICAM-1; Martin und Tremblay, 2004; Meerloo et al., 1993). Das Matrixprotein p17 befindet sich an der Innenseite der Virushülle und ist mit dieser über eine N-terminale Myristilierung verknüpft. Das Viruskapsid ist von zylindrischer Gestalt und wird durch das p24-Antigen „core antigen“ gebildet. Im Inneren des Kapsids befinden sich zwei Kopien virale Einzelstrang-RNA. Die Virus RNA ist gebunden an das Nukleoprotein p7, das wiederum die RT bindet. Neben der RT befinden sich im Kapsid weitere Enzyme die für die Virusreplikation nötig sind, die Integrase p32 und Protease p11.

2.2 Genomischer Aufbau

Das HIV Genom besteht aus einer Einzelstrang RNA mit einer 5'Cap-Struktur und einer 3'Polyadenylierung. Der Aufbau des retroviralen Genoms ist: 5'LTR-gag-pol-env-LTR 3'. LTR steht für long terminal repeat. Das HIV Genom codiert für drei Hauptstrukturproteine (gag, pol, env), Regulatorproteine (tat, rev) und akzessorische Proteine (vpu, vpr, vif und nef). Aus den gag-pol-env Vorläuferproteinen entstehen die Struktur-, Hüll- und Enzymproteine des Virus. Das in die DNA des Wirtes integrierte Provirus hat eine Länge von 9,8 Kilobasen (Muesing et al., 1985).

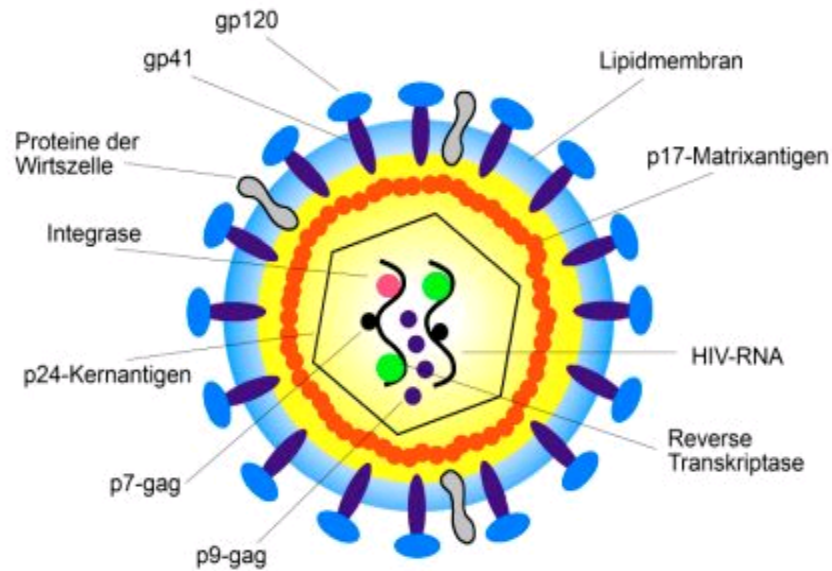


Abbildung 2.1: Struktureller Aufbau von HIV (Hoffmann et al., 2008, S. 60)

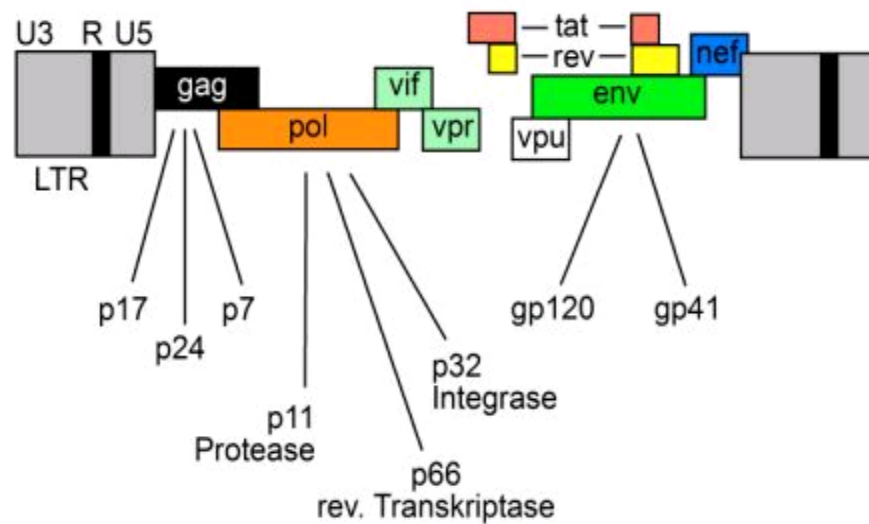


Abbildung 2.2: Genomischer Aufbau von HIV (Hoffmann et al., 2008, S. 61)

2.3 Replikationszyklus von HIV

Der wesentliche Rezeptor für HIV ist das Glykoprotein CD4, dieses wird unter anderem von T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Neben dem Glykoprotein CD4 sind für die Bindung und das Eindringen des Virus in die Wirtszelle Korezeptoren, CCR5 auf monozytären Zellen (Dragic et al., 1996) und CXCR4 auf T-Zellen (Feng et al., 1996), nötig. HIV bindet mittels gp120 zunächst an den CD4 Rezeptor der Wirtszelle. Dadurch wird eine Konformationsänderung im gp120 induziert und gp120 bindet mit seiner V3-Schleife an den Korezeptor. Über gp41 kommt es zum Verschmelzen von Virus- und Wirtszellmembran und das Kapsid des Virus gelangt in die Wirtszelle.

Nach dem Eindringen in die Zelle wird aus dem RNA-Genom von HIV durch die RT des Virus die freie provirale, doppelsträngige DNA erzeugt. Zunächst wird aus dem viralen RNA-Einzelstrang durch reverse Transkription (RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität) ein DNA-Einzelstrang erzeugt. Die RNA wird durch die Ribonucleasefunktion der RT verdaut. Der DNA-Einzelstrang dient als Matritze für den Komplementärstrang. Dieser wird ebenfalls durch die RT synthetisiert (DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität). Die Integration der proviralen Doppelstrang-DNA in das Wirtsgenom erfolgt nach Aktivierung der Zelle durch das virale Enzym Integrase. Aus der integrierten proviralen DNA entstehen durch Transkription und Translation neue Viren. Aus den codierenden viralen Genen entstehen durch Transkription und Translation Präkursorproteine, die durch die HIV-Protease in die viralen Proteine gespalten werden; aus env entsteht gp120 und gp41; aus gag entsteht p24, p17, p9 sowie p7 und aus pol RT, Integrase und Protease. Die Strukturbestandteile des Virus lagern sich zusammen, durch Reifung (Spaltung der Präkursorproteine durch die virale Protease) und Ausknospung („budding“) aus der Wirtszelle werden neue infektiöse Viren gebildet. Beim „budding“ werden Proteine aus der Wirtszellmembran in die Hülle von HIV aufgenommen (Frank et al., 1999), besondere Bedeutung hat hierbei die Integration von HLA-DR Proteinen in die Virushülle (Cantin et al., 1996).

2.4 HIV und Komplement

2.4.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil des unspezifischen, humoralen Abwehrsystems des Körpers. Seine Hauptaufgaben sind Lyse von als fremd erkannten Zellen, Aktivierung immunkompetenter Zellen und Opsonierung von Antigen-Antikörper-Komplexen, wodurch deren Phagozytose gefördert wird. Das Komplementsystem besteht aus mehr als 20 Proteinen, die in inaktiver Form vorliegen und kaskadenartig aktiviert werden. Es wird der klassische und der alternative Weg der Komplementaktivierung unterschieden. Beide münden in eine gemeinsame Endstrecke, der zur Ausbildung des Membranangriffskomplexes (MAC) führt.

Der klassische Weg wird durch Antikörper, gebunden an Zellen, oder Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert. Das Komplementprotein C1 bindet an den Antikörper und aktiviert das C4 Protein. Das C4 aktiviert C2, dieser C42- Komplex, bildet die so genannte

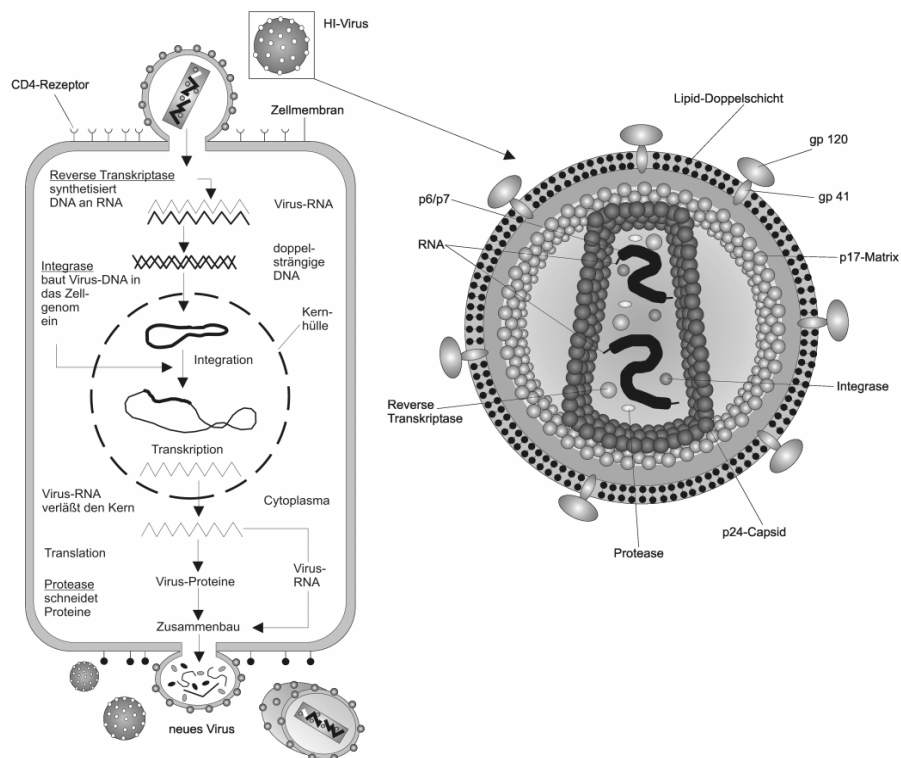


Abbildung 2.3: HIV Replikationszyklus (Wikipedia, 2009)

C3/C5 Konvertase und aktiviert zunächst C3 und anschließend C5.

Der alternative Weg wird unabhängig von der Gegenwart spezifischer Antikörper z. B. durch Polysaccharide der Bakterienzellwand aktiviert. Hierbei reagiert C3 mit der Oberfläche des Organismus und assoziiert mit dem Plasma Protein Faktor B; Faktor B wird durch Faktor D gespalten und dadurch aktiviert. Es entsteht der C3bBb-Komplex, eine C3/C5 Konvertase. Diese aktiviert weitere C3 und C5 Proteine.

Die gemeinsame Endstrecke des klassischen und alternativen Wegs ist die Ausbildung des MAC. Die Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 werden gebunden und aktiviert. Der MAC bildet eine Pore in die Zielzelle, wodurch diese lysiert wird.

In die Aktivierung des Komplementsystems greifen zahlreiche Proteine regulatorisch ein. So wirken unter anderem der decay accelerating Faktor (DAF), Faktor I und Faktor H der Aktivierung entgegen.

Viren können entweder den klassischen, den alternativen oder auch beide Komplementwege aktivieren. Viren können durch das Komplementsystem auf unterschiedliche Weise neutralisiert werden, durch Aggregation der Viren, Lysis der infizierten Zelle, Aktivierung inflammatorischer Zellen oder Opsonierung der Viren.

2.4.2 HIV und Komplement

HIV aktiviert das Komplementsystem durch den klassischen und den alternativen Weg (Montefiori et al., 1992). Das HIV Hüllprotein gp41 bindet und aktiviert den Komplementfaktor C1 (Ebenbichler et al., 1991). Die Aktivierung von C1 führt zur Anlagerung des Komplementfaktors C3 auf das Virus und die infizierte Zelle (Joling et al., 1993). HIV besitzt in seiner Hüllmembran Regulatorproteine des Komplementsystems, wie DAF und das Membran Cofaktor Protein. Zudem besteht eine Interaktion zwischen den Glykoproteinen gp41 und gp120 des Virus und dem Komplement Faktor H (CFH). DAF, Membran Cofaktor Protein und CFH sind negative Regulatoren des Komplementsystems und verhindern die Ausbildung des MAC und so die Lyse des Virus (Ebenbichler et al., 1991; Stoiber et al., 1996). HIV kann in Gegenwart von Antikörpern via Komplement an Komplementrezeptor tragende Zellen und an Komplementrezeptoren (CR) binden (Zhou und Montefiori, 1996; Montefiori et al., 1992, 1993). Die Komplementfaktoren sind konserviert und verändern also, anders als Proteine von HIV, ihre Struktur nicht durch Mutationen. Komplementfaktoren können deshalb als mögliche Angriffspunkte für ein Affinitätsbindungsverfahren von HIV dienen.

2.5 HIV und der Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA) Klasse 2

2.5.1 HLA 2

HLA Proteine sind Teil des Abwehrsystems des Körpers, es sind Transmembranproteine, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Aufgabe von HLA Proteinen ist die

Präsentation von Antigenen gegenüber T-Lymphozyten, die eine Immunantwort auslösen. HLA 1 Komplexe präsentieren Antigen gegenüber CD8-Lymphozyten, HLA 2 Komplexe gegenüber CD4-Lymphozyten. HLA 1 Komplexe werden von den meisten kernhaltigen Zellen des Körpers gebildet, wohingegen HLA 2 Komplexe von immunkompetenten, zur Phagozytose befähigten Zellen gebildet werden. Zu den HLA-Antigenen der Klasse 2 gehören die Isotypen HLA-DP, -DQ, -DR sowie -DN und -DO. HLA 2 wird von antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, follikulär dendritischen Zellen, sowie B-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Antigenpräsentierende Zellen nehmen Antigene (z. B. Viren) durch Phagozytose auf, diese werden in sog. Lysosomen prozessiert und die prozessierten Antigene auf HLA 2 Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert.

Der Genlocus der HLA Komplexe liegt auf Chromosom 6 und Chromosom 15.

HLA 2 ist ein heterodimeres Glykoprotein, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, mit einem Molekulargewicht von 31000-34000 (α) und 26000-29000 (β). Sowohl die α - als auch die β -Kette besteht aus einer externen Region, einer transmembranösen Region und einem cytoplasmatischen Schwanz. Die externe Region wird jeweils in zwei Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$ und $\beta 2$ unterteilt. Die α - und β - Ketten assoziieren in den externen Domänen über nicht kovalente Bindungen. Die $\alpha 2$ - $\beta 2$ Domänen sind Nahe der Plasmamembran lokalisiert, wohingegen die $\alpha 1$ - $\beta 1$ Domänen sich am äußeren Ende des Proteins befinden und gemeinsam eine Mulde bilden, in der das prozessierte Antigen dem T-Zellrezeptor dargeboten wird.

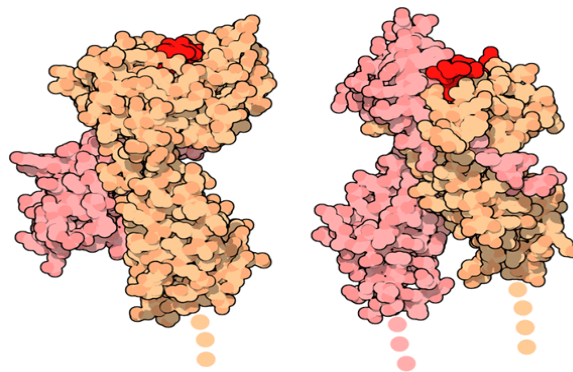


Abbildung 2.4: Tertiärstruktur von HLA 1 und HLA 2 (The Protein Data Bank, 2007)

2.5.2 HIV und HLA 2

HIV enthält in seiner Hüllmembran neben den viruseigenen Glykoproteinen gp41 und gp120, Proteine, die von der Wirtszelle stammen. HIV wird durch „Ausknospung“ aus der Wirtszelle freigesetzt, es inkorporiert dabei einige Zellmembranproteine, wie HLA-DR, β_2 -Mikroglobulin, ICAM-1, LFA-1, CD43, CD44, CD63 und den Transferrin Rezeptor (Cantin et al., 1996). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschränkt sich die Betrachtung auf, in die

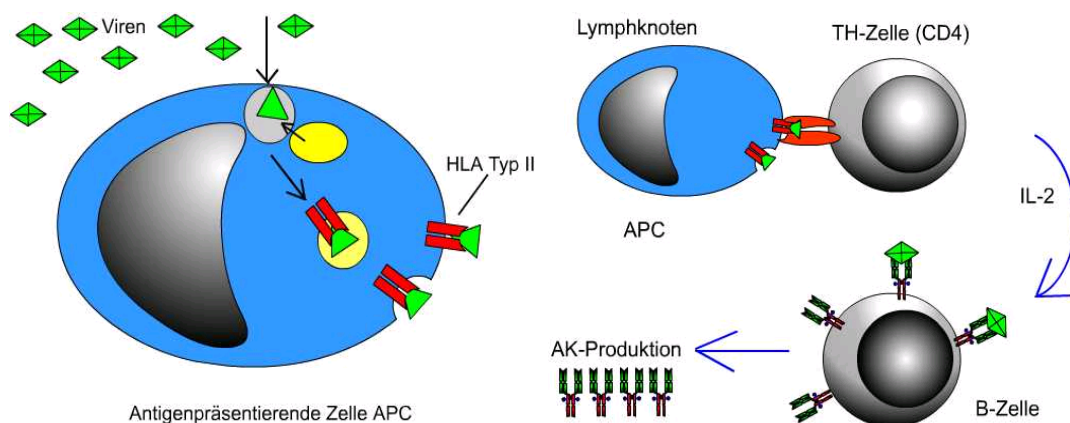


Abbildung 2.5: Mechanismus der Antigenpräsentation auf HLA Klasse 2 Proteinen (Biorama, 2009)

Virushülle aufgenommene HLA 2 Komplexe. HIV inkorporiert in seine Hüllmembran den HLA 2 Isotyp HLA-DR; zur Aufnahme der Isotypen HLA-DP und HLA-DQ existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben (Cantin et al., 1996; Dominique Schols und Clercq, 1992). Pro Virus befinden sich durchschnittlich 50-63 HLA 2 Proteine in der Hüllmembran (Trubey et al., 2003). Die Präsenz von HLA-DR in der Virusmembran verbessert die Anlagerung des Virus an seine Zielzellen und steigert die Infektiosität von HIV-1 (Martin und Tremblay, 2004). Mehrere Autoren meinen, dass das Vorhandensein von HLA-DR über verschiedene Mechanismen zur virusvermittelten Immundefizienz beiträgt. So bindet, nach Meinung von Trubey, HLA-DR an der Virusoberfläche an den T-Zellrezeptor von CD4⁺ T-Zellen und regelt die T-Zellfunktion herab (Trubey et al., 2003). Virus gebundenes HLA 2 kann zudem Superantigene gegenüber T-Zellen präsentieren, was darauf hindeutet, dass HLA 2 auf der Virusoberfläche seine funktionelle Aktivität beibehält (Rossio et al., 1995). Zudem gibt es Hinweise, dass HLA-DR eine Rolle bei der Zusammenlagerung und Freisetzung neuer Virionen aus der Wirtszelle spielt (Finzi et al., 2006). HLA 2 Proteine in der Hüllmembran von HIV sind konserviert, verändern also, anders als Proteine von HIV, ihre Struktur nicht durch Mutation und können so als mögliche Angriffspunkte für ein Affinitätsbindungsverfahren von HIV dienen.

2.6 HIV Therapie

Nachdem 1983 der Erreger von AIDS identifiziert war, begann die Suche nach medikamentösen Interventionsstrategien, welche die Virusreplikation unterdrücken und das Immunsystem rekonstruieren. Im Jahre 1987 wurde mit AZT das erste Medikament eingeführt. AZT ist ein nukleosidischer RT-Inhibitor (NRTI), seine Zielstruktur ist die RT des Virus. Derzeit stehen fünf verschiedene Klassen von Medikamenten für die HIV Therapie zur Verfügung: nukleosidische RT-Inhibitoren (NRTIs), nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTIs), Proteaseinhibitoren, Inhibitoren der Virusaufnahme (je ein Anlagerungs-

und ein Fusionsinhibitor) sowie ein Integraseinhibitor.

Derzeit wird an der Entwicklung sog. Maturations-Inhibitoren („Reifungshemmer“ = Hemmung der Reifung und Knospung neuer Virionen) intensiv gearbeitet.

Neben der gezielten Bekämpfung des Virus sind Aufklärung und Betreuung der Patienten, sowie die Therapie opportunistischer Infektionen und Nebenwirkungen der antiretroviralen Therapie wesentliche Säulen einer optimalen HIV Therapie.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit beschränkt sich die Betrachtung der retroviralen Therapie auf Hemmstoffe der RT von HIV.

2.6.1 Hemmstoffe der RT

2.6.1.1 Nukleosidische RT-Inhibitoren (NRTI)

NRTIs hemmen die DNA Synthese der RT, indem sie als „falsche Bausteine“ mit den im Menschen vorkommenden Deoxy-Nukleotiden konkurrieren. Der Einbau der NRTIs induziert einen Kettenabbruch in der DNA Synthese. Ursache hierfür ist das Fehlen einer 3'OH-Gruppe am Zuckermolekül (Ribose) der NRTIs.

2.6.1.2 Nicht-Nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTI)

NNRTIs hemmen die DNA Synthese der RT, indem sie das katalytisch aktive Zentrum der RT blockieren. NNRTIs binden nicht kompetitiv nahe der Substratbindungsstelle für Nukleoside.

2.6.2 Resistenzentwicklung gegenüber antiretroviraler Medikation

Die Unterdrückung der Virusreplikation durch Virostatika wird durch das Auftauchen resistenter Viren gegen die eingesetzten Medikamente begrenzt. Das Auftreten resistenter Viren wird durch die hohe Mutationsrate im HIV Genom begünstigt. Diese lässt sich auf das Fehlen einer Proofreading Funktion während der RNA-abhängigen DNA-Synthese durch die RT erklären. Es wird geschätzt, dass sich jedes neu kopierte Genom im Durchschnitt in einem Nukleotid vom Muttervirus unterscheidet (Mansky und Temin, 1995). Zusätzlich begünstigt wird das Auftreten von resistenten Viren durch den hohen Turnover von HIV. Jeden Tag entstehen ca. 10 Milliarden neuer Viruspartikel (Perelson et al., 1996). So wurden Mutationen die zur Medikamentenresistenz führen schon im RT Gen von Patienten nachgewiesen, die nie antiretrovirale Medikamente erhalten haben (Nájera et al., 1994). Durch Mutation entstehen Viren, die nicht zur Replikation befähigt sind (letale Virusmutanten), Viren deren Replikationsleistung eingeschränkt ist, die jedoch unter bestimmten äußeren Bedingungen einen Selektionsvorteil besitzen (z. B. Resistenzen gegenüber Virostatika) und Viren deren Phänotyp sich nicht verändert.

2.7 HIV Diagnostik

Die virologische HIV Diagnostik verfolgt das Ziel, eine Infektion mit HIV nachzuweisen und dem behandelnden Arzt Parameter in die Hand zu geben, die ihm eine optimale Therapie ermöglichen.

Um eine Infektion mit HIV nachzuweisen können indirekte Nachweismethoden, d. h. der Nachweis HIV-spezifischer Antikörper oder direkte Nachweismethoden, d. h. der Nachweis des Virus oder seiner Bestandteile (Proteine, Genom) durchgeführt werden.

Das virologische Monitoring eines an HIV erkrankten Patienten umfasst die Kontrolle der Viruslast, die Erfassung von Resistenzen gegenüber Virostatika sowie die Kontrolle des Immunstatus (z. B. durch Bestimmung der CD4⁺-Lymphozyten im peripheren Blut).

2.7.1 Antikörpernachweismethoden

Als Serokonversion wird der Zeitpunkt bezeichnet, ab dem nach Virusaufnahme und initialer Virämie, Antikörper gegen HIV im Patientenblut nachweisbar sind. Die Zeitspanne zwischen Infektion und Serokonversion, auch diagnostische Lücke genannt, beträgt in der Regel 4–6 Wochen. In sehr seltenen Fällen sind auch nach mehr als 6 Monaten keine Antikörper nachweisbar (Busch und Satten, 1997).

Als Suchtest auf HIV Antikörper werden ELISA- (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) und MEIA- (Mikropartikel Enzyme Immuno Assay) Techniken verwendet. Diese Tests zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wird nach positivem Antikörpersuchtest ein Bestätigungstest (Immunoblot) durchgeführt.

2.7.2 Virusnachweismethoden

Der Nachweis viraler Proteine wird mittels ELISA-Technik durchgeführt. Das Zielprotein ist das p24 Antigen von HIV-1 (Core-Antigen). Der Nachweis von p24 Antigen ist abhängig von der Viruslast und dem Auftreten von Anti-p24 Antikörpern.

Der Nachweis von Virusgenom kann auf zwei Arten erfolgen; als Nachweis proviraler DNA in Leukozyten oder als Nachweis freier Virus RNA aus Viruspartikeln. Der Nachweis wird mit Hilfe der polymerase chain reaction (PCR) geführt und kann qualitativ und quantitativ erfolgen. Die Bestimmung der Viruslast (quantitativ) dient zur Diagnostik, zur Abschätzung der Prognose des Patienten, als therapeutischer Marker um den Effekt antiviraler Therapie zu überwachen und um die Infektiösität des Patienten abzuschätzen (Berger und Preiser, 2002).

Eine weitere direkte Nachweismethode ist die Virusisolierung und Anzucht in der Zellkultur. Diese ist jedoch sehr arbeitsaufwändig und setzt das Vorhandensein eines Labors der Sicherheitsstufe 3** voraus.

2.7.3 Diagnostische Lücke

Als diagnostische Lücke wird der Zeitraum zwischen Virusaufnahme und der Serokonversion benannt. Um die diagnostische Lücke zu verkleinern wurden kombinierte anti-HIV-1/2/O Antikörper und p24-Antigen-ELISA Tests entwickelt (Brust et al., 2000).

2.7.4 HIV Resistenztestung

Durch die Entwicklung antiretroviraler Therapieregime kann die Virusreplikation und damit die Krankheitsprogression mit Auftreten AIDS definierender Erkrankungen verzögert werden und eine partielle Rekonstitution des Immunsystems erreicht werden (Brodt et al., 1997). Durch Mutationen des Virus kann es zu einer veränderten Ansprechbarkeit auf die antiretroviralen Medikamente und damit zu einem Therapieversagen kommen (Clavel und Hance, 2004). Mutationen auf Genomebene können zu Änderungen in der Aminosäuresequenz und damit zu einer Änderung der Tertiär- und Quartärstruktur der viralen Proteine führen. So sind einige Mutationen in der pol-Sequenz des HIV Genoms bekannt, die über eine Veränderung der Tertiärstruktur der RT zu einer reduzierten Wirkung der NRTIs und NNRTIs führen (de Mendoza et al., 2002).

Um die Resistenz von HIV gegenüber den verschiedenen antiretroviralen Medikamenten abzuschätzen und damit eine gezieltere Therapie zu ermöglichen, werden Resistenztests durchgeführt. Es lassen sich dabei zwei verschiedene Ansätze unterscheiden; die genotypische Resistenztestung und die phänotypische Resistenztestung.

Im weiteren beschränkt sich die Darstellung der Resistenzbestimmung auf Resistenzen der RT von HIV gegenüber NRTIs und NNRTIs.

2.7.4.1 Genotypische Resistenztestung

Bei der genotypischen Resistenztestung wird die provirale DNA aus Lymphozyten oder die virale RNA aus Patientenplasma sequenziert und anschließend mit der Genomsequenz des Wildtyp-Virus verglichen. Die Mutationen werden über die direkte Sequenzierung des amplifizierten HIV-Genoms oder durch spezifische Hybridisierungsverfahren mit Wildtyp- bzw. mutanten Oligonukleotiden nachgewiesen (Hoffmann et al., 2008, S. 330f.). Mutationen, d. h. Basenaustausche in der DNA, können zur Veränderung aminosäurecodierender Basentriplets, sog. Codons, und so zu Änderungen in der Aminosäuresequenz der Proteine führen.

Basis für die Interpretation genotypischer Resistenzmuster ist die Korrelation zwischen Genotyp, Phänotyp und klinischem Ansprechen. Entsprechende Daten kommen aus In-vitro-Selektionsstudien, aus klinischen Beobachtungen oder aus zahlreichen Doppelmessungen, bei denen Mutationen auf ihre phänotypische Resistenz untersucht wurden (Hoffmann et al., 2008, S. 330f.). Die Resistenzbestimmung erfolgt hierbei indirekt. Anhand der Mutationen in der Gensequenz wird durch Vergleich mit Datenbanken resistenzassoziiierter Mutationen (z. B. Stanford Database: <http://hivdb.stanford.edu/>, HIV-Grade: <http://www.hiv-grade.de/cms/grade>) die Empfindlichkeit des Virus gegenüber antiviraler

Medikation abgeschätzt.

2.7.4.2 Phänotypische Resistenztestung

Phänotypische Resistenztestung versucht die Empfindlichkeit des Virus auf ein Medikament direkt zu messen und stellt damit eine Annäherung an die Geschehnisse im Patienten dar. Phänotypische Resistenztestung misst die Möglichkeit eines HIV-1 Isolates in Gegenwart eines Medikaments zu replizieren, oder alternativ die Inhibition der Enzyme RT/Protease durch ein Medikament. Die Empfindlichkeit von HIV-1 wird durch Bestimmung der Medikamentenkonzentration abgeschätzt, die 50% oder 90% der Virusreplikation oder der enzymatischen Aktivität hemmt (IC_{50} und IC_{90}). Der Vergleich der gemessenen IC_{50} und IC_{90} Werte eines Virus, mit einem HIV-1 Wildtyp Virus als Referenz, ermöglicht eine direkte Messung der Resistenzlage gegenüber einem Medikament (Hertogs et al., 1998).

Es existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten phänotypischer Resistenztestungen. Das erste Verfahren ist die Herstellung rekombinanter Viren zur Durchführung phänotypischer Resistenztests. Hierbei wird HIV-RNA aus Plasma von Patienten extrahiert, die extrahierte RNA wird durch Zusatz von RT in cDNA umgeschrieben. Ein Teil der pol-Sequenz der entstandenen cDNA, enthält die RT-codierende und/oder die Protease-codierende Region. Diese wird mittels PCR amplifiziert und mittels Co-Transfizierung in $CD4^+$ -T-Lymphozyten, die ein HIV cDNA Plasmid enthalten, dem die RT und/oder die Protease Region fehlt, eingebracht. In der Zellkultur werden so rekombinante, infektiöse Viren gezüchtet, die die Gensequenz der RT und/oder Protease, des Patienten aufweist (Hertogs et al., 1998). Aus dem Zellkulturüberstand können nun rekombinante HI-Viren gewonnen und in einen phänotypischen Resistenztest eingebracht werden. Diese Methode ist allerdings sehr arbeitsintensiv und es werden ca. 4 Wochen benötigt um einen phänotypischen Resistenztest durchführen zu können. Zudem ist ein Gentechniklabor der Bio-Sicherheitsstufe Klasse 3** Voraussetzung. Bei der zweiten Möglichkeit werden die Enzyme RT und/oder Protease direkt auf ihre Medikamentenempfindlichkeit untersucht. Bei diesen enzymatischen Verfahren wird direkt die biochemischen Aktivität des Enzyms gemessen und so Aussagen über seine Kinetik getroffen. Im weiteren Verlauf beschränkt sich die Arbeit auf die enzymatischen Verfahren zur phänotypischen Resistenztestung der RT.

2.8 Messung der enzymatischen RT-Aktivität

Die Messung der enzymatischen Aktivität der RT gründet auf der Fähigkeit der RT, RNA in DNA umzuschreiben. Das zugrunde liegende Prinzip dieser Tests ist, ein vorgegebenes RNA-Template durch die RT in DNA umschreiben zu lassen. Die generierte DNA wird markiert und gemessen; aus der Menge der entstandenen DNA kann auf die enzymatische Aktivität der RT zurückgeschlossen werden. Es wurden verschiedenste Testverfahren entwickelt, die sich vor allem in der Art der eingesetzten RNA und in der Art des DNA Nachweises unterscheiden. Als eingesetzte RNA kann ein homopolymeres oder ein heteropolymeres RNA-Template verwendet werden. Die Markierung der generierten DNA kann

durch radioaktive Nukleotide (Sears et al., 1999), oder durch Markierung der Nukleotide mit Biotin und Digoxigenin und Kopplung mit Chemolumineszenz erzeugenden Systemen (Eberle und Seibl, 1992) erfolgen.

Auf Basis einer RT-PCR wurden verschiedene ultrasensitive Testverfahren zur Detektion und Vermessung von RT-Aktivität entwickelt. Diese Tests lassen sich prinzipiell in drei Teile untergliedern:

1. Umschreibung eines vorgegebenen RNA-Templates in cDNA durch die RT (RT-Aktivität)
2. Amplifikation der generierten cDNA mittels PCR
3. Nachweis des entstandenen DNA-Produkts z. B. durch Kopplung mit Chemolumineszenz erzeugenden Systemen. Beispiele für solche Verfahren sind der Amp-RT Assay (García-Lerma et al., 1998) und der PERT-Assay (Pyra et al., 1994; Chang et al., 1997).

Im Max von Pettenkofer-Institut wurde der PERT-Assay kontinuierlich weiterentwickelt und optimiert (Obermeier, 2006). Der genaue Ablauf des PERT-Assays wird im Methodenteil der Dissertation dargestellt.

2.9 Messung der RT-Aktivität aus Patientenmaterial

Um Resistenztestungen direkt vorzunehmen muss RT-Aktivität in Patientenmaterial mit ausreichender Sensitivität und Spezifität nachweisbar sein. Das direkte Einbringen von Patientmaterial (EDTA-Plasma) ohne Vorbehandlung in den Amp-RT Assay wurde von Garcia-Lerma beschrieben. Hierbei wurden 2 μ l EDTA Plasma in 48 μ l RT-Ansatz direkt eingesetzt. Es gelang der Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenproben mit einer Viruslast >1000 Viren/ml (García-Lerma et al., 1998). Im Rahmen der Dissertation von Obermeier (2006) wurde dieser Ablauf auf den PERT-Assay übertragen. Es gelang trotz Viruslasten von 10^5 Viren/ml nicht eine RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial zu detektieren.

2.9.1 Störfaktoren der RT-Aktivität in Patientenmaterial

Als Störfaktoren werden diejenigen Serum-/Plasmabestandteile bezeichnet, die die Nachweisbarkeit von enzymatischer RT-Aktivität durch ultrasensitive Testverfahren (z. B.: PERT-Assay) beeinflussen. Es werden hierbei unspezifische und spezifische Hemmstoffe unterschieden.

Im Serum/Plasma HIV negativer Personen befinden sich unspezifische Hemmstoffe des PERT-Assays, die die Messergebnisse verfälschen können. Solche unspezifischen Inhibitoren und Störfaktoren sind unter anderem:

- RNA-bindende Proteine.

- Hohe Eiweißkonzentrationen, die im RT-Schritt denaturieren und zu einem Gelieren des Reaktionsansatzes führen können.
- Nicht für den PERT-Assay optimierte Salzkonzentrationen.
- Zelluläre Polymerasen und Telomerasen mit intrinsischer RT-Aktivität, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können

HIV positives Serum/Plasma enthält neben unspezifischen Hemmstoffen, spezifische Hemmstoffe des PERT-Assays. Solche spezifischen Inhibitoren und Störfaktoren sind unter anderem:

- Antikörper gegen die Untereinheiten der RT p51 und p66.
- Bei therapierten Patienten: Virostatika mit Zielstruktur RT.

Aufgrund der Schwierigkeit RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial zu detektieren wurden Verfahren entwickelt HIV anzureichern und/oder plasmatische Störfaktoren zu reduzieren. Es werden im folgenden die bereits bestehenden Verfahren skizziert. Im Methodenteil werden die im Rahmen dieser Dissertation entwickelten und erprobten Affinitätsbindungsverfahren mittels Komplement und HLA 2 Proteine, dargestellt.

2.9.2 Anzucht von HIV in der Zellkultur

Die Anzucht von HIV kann in Spender-PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) oder in Dauerkulturen (z. B. HUT78, permanente T-Zelllymphomlinie) erfolgen. Aus EDTA Patientenplasma werden mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation infizierte Blutlymphozyten isoliert. Diese werden dann mit Spenderlymphozyten in RPMI 1640 Medium inkubiert. Ein Nachteil ist die Dauer des Verfahrens; die Anzucht der Viren benötigt ca. 2–4 Wochen. Zudem ist es möglich, dass Virussubpopulationen, die durch das antiretrovirale Therapieregime bzw. die Bedingungen in vivo insgesamt unterdrückt werden, in der Zellkultur einen Selektionsvorteil besitzen und gleichzeitig vorhandene Viruspopulationen überwuchern (Kusumi et al., 1992), sodass das Ergebnis der nachfolgenden phänotypischen Resistenztestung verfälscht wird.

2.9.3 Anreicherung von HIV durch Ultrazentrifugation

Patientenplasma wird zunächst mit einer Zentrifugation vorbereitet und von Verunreinigungen befreit. Anschließend wird es unter Kühlung ultrazentrifugiert. Das entstehende Viruspellet wird in Lysispuffer aufgenommen und in den phänotypischen Resistenztest (z. B. Amp-RT Assay oder PERT-Assay) eingebracht. Solche Protokolle wurden bereits mehrfach durch verschiedene Autoren veröffentlicht (García-Lerma et al., 1999; Pyra et al., 1994). Eine Anwendung dieser Anreicherungs-methode für HIV im klinischen Alltag erscheint schwierig. Das durch Ultrazentrifugation entstehende Viruspellet ist für das menschliche Auge unsichtbar, sodass Probleme mit der Aufnahme des Pellets entstehen können.

Zudem setzen diese Protokolle Labore mit Ultrazentrifugationseinrichtungen unter besonderen Sicherheitsstandards (Bio-Sicherheitslabore der Klasse 3**) voraus. Aufgrund der hohen Kosten von Ultrazentrifugengefäßen werden diese zudem meist mehrfach verwendet, was zusätzlich zu einem hohen Kontaminationsrisiko führt.

2.9.4 Anreicherung von HIV durch Affinitätsbindung

Das Prinzip dieser Verfahren ist, ähnlich der ELISA-Technik, HIV an einer festen Phase zu immobilisieren und Störfaktoren der phänotypischen Resistenztestung durch Waschstreps zu entfernen.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Affinitätsbindung wurden bereits mehrere Verfahren beschrieben. Zwei werden hier kurz dargestellt. Eine Möglichkeit ist, die RT von HIV direkt mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper gegen konservierte Bereiche der RT an eine feste Phase zu binden (Lennerstrand et al., 1996). Diese Versuche wurden jedoch nur mit Viren, die in Zellkultur gezüchtet wurden, durchgeführt. Plasma HIV positiver Patienten enthält ebenfalls Antikörper gegen die RT von HIV (Neumüller et al., 1991), sodass nach Lysis von HIV, die an die feste Phase gebundenen Antikörper und die Antikörper in Patientenplasma um das Antigen (RT) konkurrieren würden. Zudem würden inhibierende Antikörper die RT-Aktivität einschränken. Somit erschien diese Methode zur Aufreinigung der RT für einen phänotypischen Resistenztest ungeeignet.

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung und damit Aufreinigung von HIV bieten anionische Ionen-Austauschmedien (Malmsten et al., 2003). In den beschriebenen Versuchen wird Plasma HIV infizierter Personen zunächst mit einem Sulfhydryl reaktiven Agens inkubiert, um endogene Polymerasen zu inaktivieren, anschließend werden die Proben an einem anionischen Ionenaustauschmedium immobilisiert und Hemmstoffe der reversen Transkriptase durch Waschungen entfernt. Die höchste Bindungskapazität für HIV zeigten Anionen Austauschmedien mit tertiären und quartären Aminen. Dieses Verfahren wird bereits kommerziell von der Firma Cavid Tech AB, unter dem Namen ExaVir™ Load Kit vertrieben. Zu Beginn unserer Forschungsarbeit stand dieses Verfahren jedoch noch nicht zur Verfügung. Der Nachweis der RT-Aktivität erfolgte in diesem Verfahren nur mit konventionellen RT-Assays, also ohne PCR-Amplifikation wie im PERT- oder Amp-RT Assay. Malmsten et al. (2003) untersuchte 332 Plasmaproben HIV positiver Patienten. Er konnte in Proben mit einer Viruslast >6.900 RNA Kopien/ml zu 100% RT-Aktivität, in Proben mit einer Viruslast von 2.500–6.900 RNA Kopien/ml zu 50% und in Proben mit einer Viruslast von 50–2.500 RNA Kopien/ml zu 10% eine RT-Aktivität nachweisen.

2.10 Zielsetzung der Doktorarbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Exploration der Möglichkeit für den direkten Nachweis der RT-Aktivität aus Plasma HIV positiver Patienten mit Hilfe des PERT-Assays. Mit der optimierten Form des PERT-Assays (Obermeier 2006) gelang es nicht, wie bei (García-Lerma

et al., 1998) für den Amp-RT Assay beschrieben, RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial zu detektieren. Es wurde also nach Möglichkeiten gesucht, HIV möglichst Subtypen-unabhängig zu immobilisieren und Hemmstoffe des PERT-Assays (unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe) durch Waschschriffe zu entfernen. Als mögliche Angriffspunkte für die Immobilisierung von HIV wurde die Möglichkeit einer Affinitätsbindung via Komplement und via HLA 2 an einer feste Phase untersucht. Zur Messung der Aufreinigung von RT-Aktivität diente der PERT-Assay.

3 Material und Methoden

Im nachfolgenden Kapitel wird zunächst die Methodik für das bereits etablierte Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der RT (PERT-Assay) dargestellt. Der PERT-Assay stellt gewissermaßen das Rückgrat dieser Dissertation dar. Mit dem PERT-Assay wird überprüft, ob eine Affinitätsbindung von HIV stattgefunden hat und sich RT-Aktivität nachweisen lässt. Es werden zwei verschiedene Protokolle für den PERT-Assay vorgestellt, da die Methodik während der Forschungsarbeit kontinuierlich weiterentwickelt wurde. Das Ausleseverfahren für entstandene PCR-Produkte wurde von einer Endpunktsbestimmung mit Chemolumineszenz auf eine Real Time PCR umgestellt.

Im Anschluss daran werden die entwickelten und erprobten Methoden zur Affinitätsbindung von HIV dargestellt. Diese bilden den Kern der vorliegenden Dissertation. Im Raji-Zellmembran Assay und im Komplement-Agarose Bindungsassay wurde versucht HIV mittels Komplement an eine feste Phase zu binden und aufzureinigen. Im Anti-HLA-DR Bindungsassay und Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay erfolgte diese Bindung mittels HLA 2 Proteinen.

3.1 PERT-Assay

Der PERT-Assay dient dem Nachweis von RT-Aktivität in Proben. Das Verfahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen entwickelt (Chang et al., 1997; Pyra et al., 1994). Es lässt sich in grundsätzlich in drei Arbeitsprozesse unterteilen:

1. RT-Schritt: Erzeugung von cDNA aus einer im Überschuss vorgegebenen Menge RNA durch die in der Probe enthaltene aktive RT.
2. PCR-Schritt: Amplifikation der im Arbeitsprozess 1 generierten cDNA mittels PCR.
3. Nachweis der generierten DNA.

Die Arbeitsschritte 2 und 3 können durch eine Real Time PCR zusammengefasst werden.

Der PERT-Assay wurde kontinuierlich optimiert und als Real Time PCR mit Light Cycler Technologie etabliert (Obermeier, 2006).

Im PERT-Assay ist die eingesetzte Menge des RNA-Templates bekannt. Das RNA-Template ist im Überschuss vorhanden, das Ausmaß der entstehenden cDNA ist also von der RT-Aktivität in der Probe abhängig. Durch Quantifizierung der im PCR-Schritt entstandenen cDNA kann auf die RT-Aktivität der Probe zurückgeschlossen werden.

3.2 RT-Schritt des PERT-Assays

3.2.1 Quellen für RT

3.2.1.1 HIV-1 Dauerkultur

Im Max von Pettenkofer-Institut wird das HIV-Isolat eines Münchner HIV Patienten als Dauerkultur auf HUT78-Zellen als Laborstamm (MvP-899, HIV-1/M Subtyp B) gezüchtet. Als Quelle für die RT dient Zellkulturüberstand (1ml Zellkulturüberstand enthält ca. 10^8 Viren/ml). Frischer Zellkulturüberstand wurde in die unterschiedlichen Testreihen zur Affinitätsbindung eingesetzt. Nach Durchlaufen der Testreihe zur Affinitätsbindung wurde HIV aus der Zellkultur mit Lysispuffer bei 37°C inaktiviert (Inkubationszeit 30 min) und so die RT freigesetzt.

<i>Substanz</i>	<i>Molarität</i>
KCl	250mM
Tris-HCl pH 8,3	50mM
MgCl ₂	50mM
EGTA	4mM
DTT	50mM

Tabelle 3.1: Reaktionspuffer (R10-Puffer) mit optimierten Elektrolytkonzentrationen für den RT-Schritt des PERT-Assays: 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer (5R10M10T)

Der 5R10-Puffer ist die Grundlösung für den R10-Puffer. Der 5R10-Puffer ist gegenüber den R10-Puffer 5-fach konzentriert.

Als Lysispuffer wurde R10-Puffer mit 0,2% Triton X als Lysisdetergens verwendet.

3.2.1.2 Patientenmaterial

HIV positives Patientenplasma wurde durch das Max von Pettenkofer-Institut nach Abschluss der Viruslastbestimmung (mittels Cobas Amplicor Monitor von Roche Diagnostics) und Anonymisierung der Patientendaten zur Verfügung gestellt.

HIV positives Plasma und Serum mit einer erwarteten Viruslast von >1000 Kopien/ml wurde nach Einverständnis der informierten Patienten durch die HIV Ambulanz des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität (Leitung: Prof. Göbel/Prof. Bogner) zur Verfügung gestellt, sodass die Patientenproben ohne lange Lagerungszeit (Beeinflussung der RT-Aktivität durch Einfrieren und Auftauen) in die Testreihen zur Affinitätsbindung eingesetzt werden konnten.

3.2.1.3 Rekombinante HIV RT

Zur Überprüfung des PERT-Assays und als Positivkontrolle wurde eine in *E. coli* erzeugte rekombinante RT verwendet (RT HIV-1, Roche Biochemicals, Art.-Nr. 1465333).

3.2.2 Reaktionsbedingungen der reversen Transkription

Im RT-Schritt des PERT-Assays wird eine vorgegebene RNA mittels einer unbekannt Menge RT in cDNA umgeschrieben. Die Versuche im Rahmen dieser Dissertation wurden mit einem heteropolymeren RNA-Template durchgeführt. Es handelte sich um die RNA eines RNA-Virus, das in seiner Replikation keine DNA-Zwischenstufe besitzt. Es wurde die RNA des Levivirus Enterobacteriophage MS2 verwendet. Diese ist kommerziell erhältlich (MS2-RNA, Roche Biochemicals, Best-Nr. 10165948001).

Als Primer wurde der „Primer RT 3529“ verwendet. Er bindet am 3'-Ende der MS2-RNA. Es wurde mit diesem Primer eine cDNA mit ca. 1000 Basen hergestellt.

Vor Beginn der Umschreibung der MS2-RNA in cDNA musste diese linearisiert werden, anschließend erfolgte die Anlagerung des Primers. Erst danach konnte die RT mit der reversen Transkription des RNA-Stranges beginnen.

Zm Reaktionsmix mussten noch die Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und zur Dekontamination RNase-Inhibitor hinzugefügt werden.

Das Protokoll des RT-Schrittes des PERT-Assays und die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien wird in Tabelle 3.2 dargestellt.

	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur in °C</i>	<i>Zeit in min</i>
<i>Annealing</i>	Linearisierung	95	15
	Inkubation	37	30
	Stopp	Auf Eis	> 5 min
<i>Reverse Transkription</i>	Inkubation	37	240–360
	Stopp	95	7
	Kühlung	< 4	Bis Weiterverwendung

Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für den RT-Schritt des PERT-Assays

<i>Konzentration</i>	<i>Substanz</i>
0,26 μM	MS2-RNA
9 μM	RT-Primer
2,5 mM	DTT
0,4 U/ μl	RNase-Inhibitor

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Primer/Template Mischung im RT-Schritt des PERT-Assays

3.3 PCR-Schritt des PERT-Assays

Die PCR dient im PERT-Assay zur Vervielfältigung der im RT-Schritt des PERT-Assays entstandenen cDNA. Die Vervielfältigung wird limitiert durch in der Probe enthaltene

<i>Nukleotid</i>	<i>M der Stammlsg</i>	<i>Menge</i>	<i>Wasser</i>	<i>End-Molarität</i>
dATP	100 mM	3 μ l		3 mM
dTTP	100 mM	3 μ l		3 mM
dCTP	100 mM	3 μ l		3 mM
dGTP	100 mM	3 μ l		3 mM
			+88 μ l	

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Nukleotid-Mix im RT-Schritt des PERT-Assays für 100 μ l Lösung

<i>Menge in μl</i>	<i>Substanz</i>
10	5R10-Puffer
3	Primer/Template Mix
6	Nukleotid-Mix
31	Wasser
= 50	
+ 50	RT enthaltendes Material
= 100	RT-Reaktionsgemisch

Tabelle 3.5: Reaktionsansatz des RT-Schrittes des PERT-Assays für 100 μ l eingesetztes Volumen (Reaktionsansatz für nachfolgende PCR und separates Ausleseverfahren)

<i>Menge in μl</i>	<i>Substanz</i>
2	5R10-Puffer
1	Primer/Template Mix
2	Nukleotid-Mix
0,3	RNAsin
4,7	Wasser
= 10	
+ 20	RT enthaltendes Material
= 30	RT-Reaktionsmix

Tabelle 3.6: Reaktionsansatz des RT-Schrittes des PERT-Assays für 30 μ l eingesetztes Volumen (Reaktionsansatz für nachfolgenden Real Time PCR)

<i>Oligonukleotid</i>	<i>5'</i>	<i>3'</i>	<i>Schmelztemperatur $^{\circ}$C</i>
RT 3529	CAG CTA GTT ACC AAA TCG GGA G		60,4

Tabelle 3.7: Nukleotidsequenz des verwendeten RT-Primers: RT3529

Hemmstoffe der PCR z. B. Alkohol, Proteine und durch Erschöpfung der Polymerase, der Primer und der Nukleotide.

3.3.1 Dekontaminations-Strategien der PCR im PERT-Assay

Die PCR ist ein sehr sensitives Verfahren um DNA zu vervielfältigen, durch Kontaminationen z. B. früher amplifizierte DNA kann es leicht zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Im hier benutzten PCR-Protokoll wurden deshalb einige Sicherungsstrategien eingebettet.

1. *Beseitigung von verbleibender Template-RNA aus dem RT-Schritt durch RNase*

Beim PERT-Assay wird die im RT-Schritt erzeugte cDNA zusammen mit den weiteren Reagenzien des RT-Schrittes in die PCR-Reaktion eingebracht. Thermostabile DNA-Polymerasen können in einem geringen Ausmaß über eine intrinsische RT-Aktivität verfügen. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden muss das RNA-Template vor der PCR-Reaktion aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Dies wurde durch Inkubation des Reaktionsmixes mit RNase (RNase DNase frei, Roche Biochemicals, Art.Nr. 1119915) angestrebt.

2. *HotStart PCR-Methode*

Bei der HotStart PCR-Methode wird die thermostabile DNA-Polymerase erst nach der ersten Denaturierung hinzugefügt oder aktiviert. Im PCR-Protokoll, das im Rahmen dieser Dissertation benützt wurde, wurde eine chemisch modifizierte Taq-Polymerase verwendet, die erst nach einer Aufheizphase enzymatisch aktiv wird. Für die Experimente dieser Dissertation wurden folgende Polymerasen bzw. Reaktionsmische verwendet: Amplitaq Gold (Applied Biosystems Art.Nr. 4311806), FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix (Roche Biochemicals, Art.Nr. 3003248) und DNA Master Mix (Sybr Green I und Hybridization Probes).

3. *Dekontamination mit Uracil-N-Glycosylase (UNG)*

In der PCR-Diagnostik ist es sehr wichtig, eine Verunreinigung der Ausgangsreagenzien mit PCR-Produkten vorangegangener PCRs zu vermeiden. Hierzu wurden die einzelnen Arbeitsschritte der PCR räumlich getrennt durchgeführt. Eine Strategie ist die Dekontamination mit Uracil-N-Glycosylase. In der PCR werden im Elongationsschritt vorgegebene Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut. Bei der Dekontaminations-Strategie mit UNG wird das in der Natur vorkommende Nukleotid Thymidin gegen Uracil ausgetauscht. In der PCR entsteht also ein DNA-Strang der anstelle von Thymidin Uracil aufweist und somit markiert ist.

Falls ein PCR-Ansatz mit DNA aus einer vorherigen PCR verunreinigt ist, kann diese Verunreinigung durch ihre Markierung mittels UNG aus der Reaktion entfernt werden. Durch Inkubation mit UNG vor der eigentlichen PCR-Reaktion wird Uracil aus dem DNA-Strang entfernt, es entsteht so eine hitzeempfindliche Lücke im DNA-Strang. Bei der ersten Hitzedenaturierung in der PCR kommt es so zu einer Fragmentierung des DNA-Stranges und somit wird die Verunreinigung aus dem PCR-Ansatz

entfernt. Natürliche Thymidin enthaltende DNA ist von dieser Dekontaminations-Strategie nicht betroffen und kann in der PCR vervielfältigt werden.

Im Rahmen unseres Protokolls wurde eine thermolabile UNG aus dem marinem Bakterium BMTU 3346 (Roche Biochemicals, Art.-Nr.:1775375) verwendet.

3.3.2 Verwendete Reaktionsbedingungen und und PCR-Protokolle

Die Zusammensetzung der im PCR-Schritt des PERT-Assays verwendeten Reagenzien und der Ablauf der verwendeten PCR-Protokolle des PERT-Assays wird nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt. Zunächst werden die Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR, anschließend die Reaktionsbedingungen für die Real Time PCR des PERT-Assays angegeben.

Die verwendeten PCR-Primer und das entstehende PCR-Produkt wird ebenfalls in tabellarischer Form dargestellt (Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13).

<i>Endkonzentration</i>	<i>Substanz</i>
10 mM	Tris-HCl pH 8,3
50 mM	KCl
10 mM	DTT
0,8 mM	EGTA
3,0 mM	MgCl ₂
0,025 U/ μ l	Amplitaq Gold
0,01 U/ μ l	thermolabile UNG
5 ng/ μ l	RNase DNase-frei
je 1,0 μ M	Primer
je 0,2 mM	ATP, CTP, GTP
0,6 mM	UTP
	in 35 μ l Volumen
	+ 15 μ l cDNA aus RT-Schritt

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes des konventionellen PCR-Schrittes im PERT-Assay (50 μ l Reaktionsansatz)

3.3.3 Nachweis der PCR-Produkte

Die bei der PCR erzeugten PCR-Produkte wurden qualitativ durch eine Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen, eine semiquantitative Bestimmung der generierten PCR-Produkte erfolgte durch Chemolumineszenz erzeugende Nachweissysteme.

<i>Volumen</i>	<i>Substanz</i>
2	Master-Mix
1	Primer/Template
0,6	Beacon 10 mM
1	UNG 1 U/ μ l
1,5	RNase DNase-frei 0,5 μ g/ μ l
3,9	aqua dest.
10	cDNA aus RT-Schritt

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Real Time PCR im PERT-Assay (20 μ l Reaktionsansatz)

<i>Abschnitt</i>	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur in $^{\circ}$C</i>	<i>Dauer in sec</i>
RNase Verdau des RNA- Templates, De-Uracilierung, Aktivierung der Amplitaq Gold	RNA Verdau und Deuracilierung	37	1800
	Denaturierung	95	600
Amplifikation 35 Zyklen	Denaturierung	95	30
	Annealing	55	72
	Elongation	30	30
Post-PCR	Letzte Elongation	72	600
	Kühlung	< 4	bis Weiter- verwendung

Tabelle 3.10: Protokoll: Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR des PERT-Assays

<i>Abschnitt</i>	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur in °C</i>	<i>Dauer in sec</i>
Deuracilierung, Verdau des RNA-Templates, Aktivierung der DNA-Polymerase	Deuracilierung	Raumtemperatur	300
	RNA-Templete Verdau	40	300
	Denaturierung	95	300
Amplifikation 45-65 Zyklen	Denaturierung	95	5
	Annealing	55	5 (Messpunkt Beacon)
	Elongation	72	5 (Messpunkt SYBR-Dye)
Post-PCR (SYBR-Dye)	Schmelzkurve (nur SYBR-Dye)	55-95	Temperaturveränderung 0,1 °C/s
Post-PCR (Beacon bzw. Hybridisierungssonde)	Kühlen	< 4	bis Weiterverwendung

Tabelle 3.11: Protokoll: Reaktionsbedingungen der Real Time PCR des PERT-Assays

Oligonukleotid	5'	3' Sequenz	Tm in °C
Pk 2638 auch digoxygeniert als Pk 2638dig		TAg ATg gCg AgA CgA TAC gAT g	56,3
Pki 2716 auch biotinyliert als Pki 2716bioRT 3529		gTC gCT TTg ACT ATT gCC CAg A	61,1
PertK 2322		gTT gTA ggg AAC ggA gTg TTT	60,8
PertKi 2440		TAT ACC AAC ggA TTT gAg CC	54,7
PertSK 2393		TAT gAA TAT gTA CCT CCA gAA Agg g- Fluorescein	55,4
PertSKi 2419		LC-Red 640-TCg gTg CTT TCA TCA gAC gC-p	60,7

Tabelle 3.12: Verwendete PCR-Primer und Sonden

<i>Name des PCR-Produktes</i>	<i>Primer Kombination</i>	<i>Länge des PCR-Produktes</i>	<i>Position LEMS2X (Mindestumschreiblänge)</i>
Pk	Pk und Pki	101 bp	2,6 kb (0,9 kb)

Tabelle 3.13: PCR-Produkte des PERT-Assays

3.3.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Als qualitatives Nachweisverfahren der entstandenen PCR-Produkte wurde eine Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Bei diesem Verfahren wurden die PCR-Produkte in Abhängigkeit ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Im Größenvergleich mit kommerziell erhältlichen DNA Molecular Weight Markern (DNA Molecular Weight Marker V und VIII, Roche Biochemicals Best. Nr. 821705 und 1336045) konnte auf die Größe des entstandenen PCR-Produktes rückgeschlossen und abgeschätzt werden, ob es sich um ein spezifisches PCR-Produkt handelte.

3.3.3.2 Quantifizierung von PCR-Produkten

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden zwei Verfahren eingesetzt: Die Endpunktbestimmung nach Abschluss der PCR-Reaktion und die Real-Time Quantifizierung (SYBR Dye Green I und Molecular Beacons) mit LightCycler Technologie.

1. Endpunktbestimmung mit Chemolumineszenz

Zur semiquantitativen Bestimmung der entstandenen PCR-Produkte wurden zunächst Endpunktbestimmungen durchgeführt. Hierbei wurden die Primer der PCR-Reaktion Pk mit Biotin und Pki mit Dioxigenin markiert. Die Endpunktbestimmung erfolgte durch Kopplung der DNA-Produkte mit Chemolumineszenz erzeugenden Systemen.

Das in der PCR entstandene DNA-Produkt wurde mit Biotin und Dioxigenin doppelt markiert. Zur Messung wurde das entstandene Produkt zunächst über die Biotin-Gruppe an einer mit Steptavidin gecoateten Oberfläche immobilisiert (96 Well-Platte schwarz, Roche Biochemicals, Best. Nr. 1734784). Anschließend wurden Störfaktoren des Auswertsystems (z. B. unspezifische PCR-Produkte, PCR-Puffer, überschüssige Primer) durch Waschungen mit Waschpuffer weitmöglichst entfernt. Anschließend wurde ein Antikörper, der gegen die Dioxigenin-Markierung des PCR-Produktes gerichtet war und an dessen Fab-Fragment Meerrettich-Peroxidase gebunden war in das System eingebracht (Anti-DIG-POD, Roche Biochemicals, Best. Nr. 11207733910). Überschüssige Antikörper wurden nach Bindung an das Antigen durch weitere Waschschritte entfernt. Zur Quantifizierung wurde nun ein Chemolumineszenzsubstrat (Luminol/Iodophenol, Roche Biochemicals, Best. Nr. 1582950) hinzugefügt, das durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzt wurde und so Licht erzeugte. Die Menge des

emittierten Lichtes war abhängig von der Menge der gebundenen Meerrettich-Peroxidase und damit wiederum abhängig von der Menge der in der PCR entstandenen DNA. Die Messung der erzeugten Chemolumineszenz wurde in einem Chemolumineszenz-Reader ermittelt und wurde in „relative light units“ (RLU) angegeben.

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
Na-Citrat	50 mM
NaCl	1,55 M
Tween 20	0,1% (v/v)

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des bei der Endpunktbestimmung verwendeten Waschpuffers (10-fach konzentriert)

<i>Abschnitt</i>	<i>Reagenz</i>	<i>Dauer</i>
Inkubation	50 μ l PCR-Produkt	1 h
Waschung	Waschpuffer	5 mal Waschen
Inkubation	Anti-Dig-POD 200 mU/ml	1 h
Waschung	Waschpuffer	5 mal Waschen
Inkubation	Luminol/Iodophenol-Substrat	3 min
Messung		Innerhalb von 30 min

Tabelle 3.15: Reaktionsablaufs zur Endpunktsbestimmung im PERT-Assay

2. RealTimeQuantifizierung

Bei der Real-Time-Quantifizierung wurde kontinuierlich, bei jedem PCR-Zyklus, mit Hilfe eines Chemolumineszenz erzeugenden Systems ein Fluoreszenzsignal gemessen. Es wurde der sog. cycle threshold (CT) bestimmt, also die Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, dass das emittierte Fluoreszenzsignal einen definierten cut-off Wert überschreitet. Der CT ist abhängig von der Menge der in die PCR-Reaktion eingesetzten cDNA (aus dem RT-Schritt des PERT-Assays), d. h. je mehr cDNA am Beginn der PCR zur Verfügung steht, desto weniger PCR-Zyklen sind nötig, um den cut off Wert zu durchbrechen. Im Vergleich mit einer Standard Verdünnungsreihe (eingesetzte DNA Menge für jede Verdünnungsstufe bekannt) kann auf die in der Probe vorhandene DNA Menge (abhängig von der Aktivität der reversen Transkriptase) zurückgeschlossen werden. Die verwendeten Systeme unterschieden sich im Prinzip nur durch die Art der Fluoreszenzerzeugung.

a) SYBR-Dye-Green I

Das Fluoreszenz erzeugende System SYBR-Dye-Green I ist DNA-Sequenz unabhängig. Es emittiert ein Lichtsignal nach Einlagerung zwischen doppelsträngiger DNA. Das heißt, je mehr DNA durch die PCR gebildet wird, desto mehr

Fluoreszenz wird erzeugt. Da die Erzeugung der Fluoreszenz sequenzunabhängig ist, kann durch die Interkalation des Fluorophors mit Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten ebenfalls ein Lichtsignal erzeugt werden. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte jeweils am Ende der Elongationsphase des PCR-Zyklus, da dort die größte Menge an doppelsträngiger DNA vorlag. Durch eine nach Beendigung der PCR durchgeführte Analyse der Schmelztemperaturkurven konnte zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten unterschieden werden. Bei einem hohen Anteil an unspezifischen PCR-Produkten kann eine Quantifizierung des entstandenen spezifischen PCR-Produkts schwierig oder auch nicht möglich sein.

b) *Molecular Beacons*

Das Fluoreszenz erzeugende System Molekular Beacon ist sequenzspezifisch und besteht aus einem Oligonukleotid mit einem Fluorophor am 5'Ende, dem Reporter und einem nicht fluoreszierenden Quencher (DABCYL[®]) am 3'Ende. Ungebunden bildet das Oligonukleotid eine Sekundärstruktur aus, indem Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander stehen und der Quencher so das Lichtsignal des Reporters auslöscht. Bindet das Oligonukleotid nun an den komplementären DNA-Strang im PCR-Produkt wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgelöst und ein Fluoreszenzsignal wird emittiert und kann detektiert werden. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte jeweils am Ende der Annealingphase des PCR-Zyklus, da dort die größte Menge an Molecular Beacons an das PCR Produkt gebunden war.

Oligonukleotid	5'	3'	Schmelztemperatur °C
Pertbeacon 2683	(FAM)-CCT CAT ggg TTC ACA TTT gAg	CTA gAg TCC Atg Agg- (DABCYL)	76,1

Tabelle 3.16: DNA-Sequenz des in der Real Time PCR verwendeten Molekular Beacon

3.4 Affinitätsbindungsverfahren

Ein direkter Nachweis von RT-Aktivität mit dem oben beschriebenen PERT-Assay aus Serum/Plasma HIV infizierter Patienten gelang trotz Viruslasten von 10^5 Viren/ml nicht (Obermeier, 2006).

Der Aufgabenstellung dieser Arbeit entsprechend, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Aktivität der RT direkt aus Patientenmaterial zu bestimmen. Es wurden verschiedene Verfahren der Affinitätsbindung des Virus an eine feste Phase entwickelt und untersucht, die es ermöglichen sollen, Inhibitoren des PERT-Assays aus Patientenmaterial durch Waschschrte zu minimieren bzw. zu entfernen.

Um ein zuverlässiges Affinitätsbindungsverfahren, trotz ständiger Mutationen des Virus zu entwickeln, wurden konservierte, subtypen-unabhängige Strukturen auf HIV als Angriffspunkte für ein Affinitätsbindungsverfahren gesucht. Als solche mögliche Zielstrukturen dienten für unsere Experimente das Komplementsystem und HLA 2. Als mögliche feste Phase für ein Aufreinigungsverfahren wurden unter anderem Raji-Zellmembranen, Protein-A Agarose und Dynabeads Pan Mouse IgG untersucht.

Im Folgenden werden die, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und getesteten Verfahren, Raji-Zellmembran Assay, Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay, Anti-HLA-DR Bindungsassay und Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay erläutert.

3.4.1 Raji-Zellmembran Assay

Raji-Zellen (B-Zell-Lymphom Linie) exprimieren auf ihrer Oberfläche Komplementrezeptoren, unter anderem den Komplementrezeptor 2 CD21 (CR2)(Montefiori 1993). HIV aktiviert das Komplementsystem mittels dem klassischen und alternativen Weg. Die Aktivierung des Komplementsystems scheint dabei nicht zu einer Destruktion des Virus zu führen (Zhou und Montefiori, 1996). Es wurde gezeigt, dass HIV die Fähigkeit besitzt an Zellen zu binden, die Komplementrezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren (Joling et al., 1993; Montefiori et al., 1994).

HIV sollte in diesem Versuchsaufbau komplementvermittelt an CR der Raji-Zellmembranen binden. Nach Bindung an diese feste Phase wurde versucht Hemmstoffe des PERT-Assays durch Waschungen zu reduzieren.

Der Raji-Zellmembran Assay lässt sich prinzipiell in 3 Schritte gliedern:

1. Präparation der Membranen „syringe method“
2. Bindung des Virus an die festen Phase (Raji-Zellmembranen) und Waschungen zur Abreicherung von Hemmstoffen des PERT-Assays
3. Freisetzung der RT und Einsetzen der RT in den PERT-Assay.

3.4.1.1 Anzüchtung der Raji-Zellen und Präparation der Raji-Zellmembranen

1. *Raji-Zellkultur*

Die Anzüchtung der Raji-Zellen erfolgte im RPMI Medium im Inkubator bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂. Der Mediumwechsel wurde 2-mal wöchentlich durchgeführt: Split 1:2

2. *Präparation der Raji-Zellmembranen: „syringe method“*

Auf die Methode für die Präparation der Zellmembranen konnte zurückgegriffen werden. Das Protokoll für den Ablauf der „syringe methode“ wurde von der Arbeitsgruppe Heribert Stoiber der Universität Innsbruck zur Verfügung gestellt.

Ablauf der Raji-Zellmembran Präparation:

500ml	RPMI Medium
50ml	FKS
40ml	Hepes
5ml	Penicillin
5ml	Streptomycin

Tabelle 3.17: Zusammensetzung des Anzuchtmediums für Raji-Zellen

- jeweils 1,5 ml der Raji Zellsuspension (1ml enthält ca. 10^6 Raji Zellen) werden in 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert
 - Zentrifugation der Zellsuspension: $t = 3$ min ; RZB = 200 g
 - Überstand wird dekantiert und verworfen
- Zellpellet in $500\mu\text{l}$ hypotonen Puffer pH 7,9 resuspendieren
 - Mechanische Zerstörung der Zellen: Zellsuspension wird 15x mit einer Spritze (Kanüle 25G) aufgezogen und wieder ausgespritzt
- Abtrennung der Zellkerne:
 - Suspension 10 min auf Eis lagern
 - Zentrifugation: 11 min bei 4°C und RZB = 700 g: die Zellkerne bleiben als Pellet zurück
- Der Überstand enthält die Membranfraktion und wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführt
 - Zentrifugation für 10min bei 4°C und RZB = 17.000 g
 - Der Überstand (enthält die Zytoplasmafraktion) wird dekantiert und verworfen
 - Das Pellet enthält die Zellmembranen
- Waschung des Membranpellets 2 mal: in $250\mu\text{l}$ hypotonem Puffer
 - Membranpellet in $250\mu\text{l}$ hypotonem Puffer resuspendieren
 - Suspension 5 mal mit Spritze auf- und abziehen
 - Zentrifugation für 10min und 4°C bei RZB = 17.000 g
 - Gereinigte Membranen bleiben als Pellet zurück, der Überstand wird dekantiert und verworfen

<i>Für 50ml hypotonen Puffer pH 7,9</i>	<i>Endkonzentration</i>	
Hepes 1M	500 μl	10mM
KCl 1M	500 μl	10mM
MgCl ₂ 1M	500 μl	10mM
Destilliertes H ₂ O	48,5ml	

Tabelle 3.18: Zusammensetzung des hypotonen Puffers pH 7,9 für die Raji-Zellmembranpräparation nach der „syringe method“

3.4.1.2 Affinitätsbindung an Raji Zellmembranen

In den Experimenten zum Raji-Zellmembran Assay wurden Viren aus der HIV Dauerkultur MvP 899 verwendet. Um zu überprüfen, ob eine Affinitätsbindung der Viren an Raji-Zellmembranen grundsätzlich möglich ist, wurde zunächst in 0,9%iger Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe des Zellkulturüberstandes MvP 899 angelegt. Als Quelle für Komplement diente Human Complement Serum (Human Complement Serum, Sigma Prod. Nr. S1764). Die Viren aus der Verdünnungsreihe wurden nun mit Human Complement Serum als Komplementdonor versetzt. Die so gewonnenen Proben wurden anschließend mit den Raji-Zellmembranen inkubiert. Nach stattgefundenen Bindung an die feste Phase sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch Waschung mit Pufferlösung entfernt werden. Dazu wurden die Proben zentrifugiert, die Raji-Zellmembranen mit gebundenem Virus bildeten ein Pellet, der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Nach Abschluss der Waschschrirte wurde die RT durch Lysis freigesetzt und in den PERT-Assay eingebracht.

Die Reaktionsbedingungen während der Bindungsschrittes und während des Lysisschrittes des Raji Zellmembranassays wurden variiert.

Im Folgenden wird der Ablauf des Raji-Zellmembranassays und die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien tabellarisch dargestellt (Tabelle 3.19 und 3.20).

<i>Abschnitt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Bindung an feste Phase	Inkubation der Probe mit Raji-Zellmembranen	200 μ l MvP 899 Überstand in gewünschter Verdünnung	2 h bei 37°C <hr/> 2 h bei 4°C
	Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes		10 min bei 4°C und RZB = 17.000 g
	Pellet in Waschpuffer aufnehmen	500 μ l R10-Puffer	
Waschung 2x	Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes		10 min bei 4°C und RZB = 17.000 g
Lysierung	Freisetzung der RT	100 μ l Lysispuffer	30 min bei 37°C <hr/> 30 min bei 4°C

Tabelle 3.19: Ablaufprotokoll des Raji-Zellmembranassays

Als Waschpuffer wurde R10-Puffer verwendet, da die Salzkonzentrationen des Puffers

KCl	250mM
Tris-HCl pH 8,3	50mM
MgCl ₂	50mM
EGTA	4mM
DTT	50mM

Tabelle 3.20: Zusammensetzung des Waschpuffers im Raji-Zellmembransassay: 5R10-Puffer (R10-Puffer 5fach konzentriert)

für den RT-Schritt des PERT-Assays optimiert sind. Als Lysispuffer wurde R10-Puffer mit 0,2% Triton X als Lysisdetergens verwendet.

Lysispuffer: R10 Puffer + 0,2% Triton X

3.4.2 Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay

Als zweites Verfahren zur Affinitätsbindung wurde der Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay entwickelt und getestet. Mit diesem Assay wurde ein mögliches Affinitätsbindungsverfahren untersucht, bei dem der Komplementfaktor C3d auf HIV als Zielstruktur dient. Als feste Phase wurde Protein-A Agarose (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 719 408) verwendet. An Protein-A Agarose wurden Antikörper (DAKO, Rabbit Anti-Human C3d Complement, Code No. A 0063), gerichtet gegen die Komplementkomponente C3d, gebunden. Die Komplementkomponente C3d entsteht durch Spaltung des Komplementfaktors C3 und ist in der Membran von HIV verankert. Die Komplementkomponente C3d ist auch der Bindungspartner von CR2 (Joling et al., 1993). Über den Antikörper sollte HIV an Protein-A Agarose gebunden werden. Durch mehrere Waschschrte sollten die Inhibitoren des PERT-Assays abgereichert werden, bevor durch Lysis die RT von HIV freigesetzt und in den PERT-Assay eingebracht wurde.

Zum Nachweis, ob eine Affinitätsbindung mit diesem Verfahren grundsätzlich möglich ist, wurde zunächst untersucht, ob sich eine RT-Aktivität in speziell präparierten Proben messen lässt. Als Virusquelle für diese Untersuchungen diente Zellkulturüberstand von MvP 899. In 0,9%iger Kochsalzlösung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Als Komplementdonor diente Human Complement Serum. In weiteren Entwicklungsschritten wurde HIV in HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze; HIV positives Plasma enthält unspezifische und spezifische Hemmstoffe des PERT-Assays) eingesät und die RT-Aktivität, nach Durchlaufen des Affinitätsbindungsverfahrens, bestimmt. Es wurde zudem HIV positives Plasma mit einer zu erwartenden Viruslast > 1.000 Viren/ml auf RT-Aktivität untersucht. Die Bestimmung der RT-Aktivität erfolgte mit dem PERT-Assay.

Der Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay lässt prinzipiell in 3 Schritte gliedern:

1. Coating der Protein-A Agarose mit Anti-C3d Antikörpern
2. Bindung von HIV an die feste Phase und Abreicherung von Hemmstoffen
3. Lysis des Virus und Freisetzung der RT

3.4.2.1 Vorbereitung der Proben

HIV aus der Dauerkultur MVP 899 wurde mit einer Komplementquelle inkubiert. Als Komplementquelle diente Human Complement Serum und HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze).

<i>Material</i>	<i>Volumen in μl</i>	
MvP 899 Überstand (ca. 10^8 Viren/ml)	333	333
Human Complement Serum	167	
HIV positives Plasma		167
	500	500

Reaktionsbedingungen: Inkubationszeit bei 37°C 30 min

Tabelle 3.21: Zusammensetzung der Proben für den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl angelegt und die Proben wurden in den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay eingebracht.

Um die RT-Aktivität aus Patientenmaterial zu bestimmen, wurde HIV positives Patientenplasma mit einer zu erwartenden Viruslast >1.000 Viren/ml (Volumen: $500\mu\text{l}$) direkt in den Komplement-HIV-Agarose-Bindungsassay eingesetzt.

3.4.2.2 Präparation der Protein A Agarose

Protein-A Agarose (Bindungskapazität für Antikörper der IgG Klasse, 10-20mg/ml) bindet Antikörper der Klasse IgG. Zur Vorbereitung der festen Phase im Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay wurden an Protein-A Agarose Antikörper gegen den Komplementfaktor C3d gebunden.

Protein-A Agarose $20\mu\text{l}$ wurde mit Antikörper Anti-C3d $40\mu\text{l}$ (entspricht ca. $160\mu\text{g}$ Antikörper) in einem 1,5 ml Eppendorf Tube versetzt. Nach Inkubation der Protein-A Agarose mit Anti-C3d Antikörpern wurden durch Waschung überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt.

- Inkubationszeit: ca. 12 Stunden bei 4°C
- Zentrifugation: RZB = 11.000 g ca. 1 min; Überstand wurde dekantiert und verworfen
- Waschung: in R10 Puffer, Volumen $200\mu\text{l}$
- Zentrifugation: RZB = 11.000 g ca. 1 min; Überstand wurde dekantiert und verworfen

3.4.2.3 Affinitätsbindung an Protein-A Agarose über C3d Antikörper

Im Bindungsschritt des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays wurden die vorbereiteten Proben mit der präparierten Protein-A Agarose inkubiert. Nach stattgefundenen Affinitätsbindung des Virus an die feste Phase sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch

mehrere Waschschritte entfernt werden. Nach Waschung der Proben wurden die gebundenen Viren lysiert und die RT freigesetzt. Die Aktivität der so gewonnene RT wurde dann mit dem PERT-Assay vermessen.

Der genaue Ablauf des Bindungsschrittes im Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay wird nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

<i>Abschnitt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Bindung an feste Phase	Inkubation der Probe mit Protein-A Agarose	Patientenplasma oder 200 μ l MvP 899 Überstand in gewünschter Verdünnung	3 h bei 37°C
	Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes		3 h bei 4°C
			1 min RZB = 11.000 g
Waschung 2x	Pellet in Waschpuffer aufnehmen	200 μ l R10-Puffer	
	Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes		1 min RZB = 11.000 g
Lysierung	Freisetzung der RT	100 μ l Lysispuffer	30 min bei 4°C

Tabelle 3.22: Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Protein-A Agarose

Nach Lysis und Freisetzung der RT wurden 50 μ l der Proben in den RT-Schritt des PERT-Assays zum Nachweis retroviraler Aktivität eingesetzt.

3.4.3 Anti-HLA-DR Bindungsassay

Als drittes Verfahren zur Affinitätsbindung wurde der Anti-HLA-DR Bindungsassay entwickelt und getestet. Mit diesem Assay wurde ein mögliches Affinitätsbindungsverfahren untersucht, bei dem HLA 2 auf HIV als Zielstruktur dient.

HIV integriert beim „budding“ aus der Wirtszelle Oberflächenproteine der Wirtszelle in seine Hüllmembran. Eine besondere Bedeutung scheint dabei HLA zu zukommen. HIV besitzt in seiner Hüllmembran HLA 2 Proteine, unter anderem HLA-DR (Schols 1992). In diesem Verfahren wurde die Möglichkeit untersucht, HLA-DR als Zielstruktur auf HIV für ein Aufreinigungsverfahren zu verwenden. Hierbei sollte HIV mit Hilfe eines Antikörpers

gegen HLA-DR (Antikörper: Anti-HLA-DR; Konz. 5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Clone: mouse; Überstand einer Dauerzellkultur des Immunologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fr. Prof. Dr. Judith Johnson) an eine feste Phase gebunden werden.

Als feste Phase wurden Dynabeads Pan Mouse IgG (Dyna, Dynabeads Pan Mouse IgG, Prod. No. 11042) verwendet. Die feste Phase wurde mit Anti-HLA-DR Antikörpern ge-coated. Das HIV enthaltende Untersuchungsmaterial wurde mit der festen Phase inkubiert. Nach der Inkubation sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch mehrere Waschschriffe abgereichert werden. Nach Lysis des Virus wurde die RT freigesetzt und in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt.

Zum Nachweis, ob eine Affinitätsbindung mit diesem Verfahren grundsätzlich möglich ist, wurde zunächst untersucht, ob sich eine RT-Aktivität in speziell präparierten Proben messen lässt.

Als Virusquelle für diese Untersuchungen diente MvP 899 Zellkulturüberstand. Es wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9%iger Kochsalzlösung angelegt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzt und anschließend die RT-Aktivität mit dem PERT-Assay gemessen.

Der Anti-HLA-DR Bindungsassay lässt prinzipiell in 3 Schritte gliedern:

1. Coating der Dynabeads Pan Mouse IgG mit Anti-HLA-DR Antikörpern
2. Bindung von HIV an die feste Phase und Abreicherung von Hemmstoffen
3. Lysis des Virus und Freisetzung der RT

3.4.3.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Als Virusquelle diente MvP 899 Zellkulturüberstand. Es wurde zunächst in 0,9%iger Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe angelegt. Diese Proben waren frei von Plasmahemmstoffen des PERT-Assays. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob mit dem Anti-HLA-DR Bindungsassay eine RT-Aktivität nachweisbar ist. Außerdem konnte so die Sensitivität des Verfahrens unter optimalen Bedingungen untersucht werden.

MvP 899 Überstand	500 μl	10^0	Ca. 10^8 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-1}	Ca. 10^7 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-2}	Ca. 10^6 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-3}	Ca. 10^5 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-4}	Ca. 10^4 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-5}	Ca. 10^3 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-6}	Ca. 10^2 Viren/ml
0,9% NaCl	450 μl	10^{-7}	Ca. 10^1 Viren/ml

Eingesetztes Volumen im Anti-HLA-DR Bindungsassay: 450 μl

Tabelle 3.23: Verdünnungsreihe von MVP 899-Überstand in 0,9% NaCl

3.4.3.2 Präparation der festen Phase: Dynabeads Pan Mouse IgG

Dynabeads Pan Mouse IgG binden Antikörper der IgG Klasse, die in Mäusen produziert wurden. Zur Vorbereitung der festen Phase wurden die Dynabeads Pan Mouse IgG mit Antikörpern, die gegen HLA-DR gerichtet sind, ge-coated.

Vor Inkubation mit dem Antikörper wurden die Dynabeads mit einem Waschpuffer gewaschen. Zur Waschung wurde zunächst R10-Puffer verwendet, im Verlauf der Versuche wurde auf PBS+0,1% BSA Puffer pH 7,4 umgestellt, da dieser Puffer laut Firma Dynal die optimierten Salzkonzentrationen für die Antikörperbindung besitzt. Da die Dynabeads magnetisch sind, lässt sich der Überstand mit Hilfe eines Magneten (Fa. Dynal für 1,5 ml Eppendorf Tubes) einfach und scharf dekantieren.

Nach Waschung wurden die Dynabeads Pan Mouse IgG mit dem Antikörper Anti-HLA-DR inkubiert. Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurden zwei Waschschritte mit R10-Puffer bzw. PBS+0,1% BSA Puffer durchgeführt.

Nach Waschung wurden die Dynabeads bis zur Weiterverarbeitung in 50 μ l Puffer (R10-Puffer bzw. PBS+ 0,1% BSA Puffer) resuspendiert.

Der genaue Ablauf der Präparation der Dynabeads wird nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

<i>Substanz</i>	<i>Menge für 1000 ml PBS+ 0,1% BSA</i>
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O (aqua dest.)	800 ml

Tabelle 3.24: Zusammensetzung PBS+0,1% BSA-Puffer pH 7,4

Zur Fertigstellung wird der Puffer wie folgt weiterverarbeitet:

1. Einstellung des pH Wertes auf 7,4 mit konzentrierter Salzsäure (HCl)
2. Mit aqua dest. Volumen auf 1000 ml auffüllen
3. BSA (bovines serum albumin): Einstellung auf 0,1%
4. Sterile Filtration des Puffers, Aliquotierung und Lagerung bei -20°C

3.4.3.3 Affinitätsbindung von HIV über Antikörper Anti-HLA-DR

Im Bindungsschritt des Anti-HLA-DR Bindungsassays wurden die vorbereiteten Proben mit den präparierten Dynabeads inkubiert. Nach stattgefundenener Affinitätsbindung des Virus über HLA-DR an die feste Phase, sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch mehrere

<i>Abschnitt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Volumen in μl</i>
Waschung	PBS+0,1% BSA pH 7,4	200 μl
	R10-Puffer	200 μl
	Dynabeads Pan Mouse IgG	50 μl

Tabelle 3.25: Protokoll: Waschung der Dynabeads Pan Mouse IgG vor und nach Antikörperbindung

<i>Substanz</i>	<i>Bindungskapazität / Konzentration</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Dynabeads Pan Mouse IgG	25 μl = 10^7 beads binden 0,1-1 μl IgG	50 μl	Inkubationszeit ca. 12 h bei 4°C auf einem Rotor (10 Umdrehungen/min)
AK: Anti HLA-DR	5–20 $\mu\text{g/ml}$	1,3 ml	

Tabelle 3.26: Protokoll: Antikörperbindung an Dynabeads Pan Mouse IgG

Waschschritte entfernt werden. Nach Waschung der Proben wurden, die an die feste Phase gebundenen Viren lysiert und so die RT freigesetzt. Die Aktivität der so gewonnenen RT wurde mit dem PERT-Assay vermessen.

Der genaue Ablauf des Bindungsschrittes im Anti-HLA-DR Bindungsassay wird nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

Nach Lysis und Freisetzung der RT wurden 50 μl der Proben in den RT-Schritt des PERT-Assays zum Nachweis retroviraler Aktivität eingesetzt.

3.4.4 Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay

Als viertes Verfahren zur Affinitätsbindung von HIV an eine feste Phase wurde der Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay entwickelt und getestet. Der Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay ist eine Weiterentwicklung des Anti-HLA-DR Bindungsassays und entspricht diesem in seinem grundsätzlichen Aufbau und Ablauf.

Grundlage dieses Aufreinigungsverfahrens ist die Inkorporation von HLA 2 Proteinen der Wirtszelle in die Hüllmembran von HIV beim „budding“ aus der Wirtszelle (Trubey et al., 2003). Neben HLA-DR, werden auch in geringerem Umfang HLA-DP und HLA-DQ in die Hüllmembran von HIV aufgenommen. Als Zielstruktur unseres Aufreinigungsverfahrens dienten HLA 2 Proteine, da diese unabhängig von Virusmutationen sind.

Als feste Phase wurden Dynabeads Pan Mouse IgG verwendet. Diese sind mit Antikörpern ge-coated, die gegen das Fc-Segment von Mäuse IgG gerichtet sind. An diese Antikörper wurden Maus Antikörper gebunden, die gegen HLA-DR+DP+DQ Proteine (Anti-HLA-DR+DP+DQ Antikörper, Pharmingen, Prod. Nr: 32381A) des Menschen gerichtet sind. Nach Bindung der Antikörper standen die Dynabeads als feste Phase für das

<i>Abschnitt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Bindung an feste Phase	Inkubation der Probe mit gecoateten Dynabeads	Patientenplasma oder 899-Überstand in gewünschter Verdünnung	2 h bei 4°C auf einem Rotor (10 Umdrehungen/min)
	Dekantieren des Überstandes		Raumtemperatur
Waschung 3x	Dynabeads in Waschpuffer aufnehmen	200 µl R10-Puffer 200 µl PBS 0,1% BSA	Raumtemperatur
	Dekantieren des Überstandes		Raumtemperatur
Lysierung	Freisetzung der reversen Transkriptase	60 µl Lysispuffer	30 min bei 4°C

Tabelle 3.27: Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Dynabeads Pan Mouse IgG im Anti-HLA-DR Bindungsassay

Affinitätsbindungsverfahren zur Verfügung.

Es wurden Affinitätsbindungsversuche mit Viren aus der Zellkultur MvP 899 durchgeführt. In der weiteren Entwicklung des Aufreinigungsverfahrens wurden schrittweise die Bedingungen im Patientenmaterial simuliert. Im ersten Schritt wurden die Viren in R10-Puffer, im zweiten Schritt in HIV negatives Serum und im dritten Schritt in HIV positives Serum (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) eingespeist.

Eine Verdünnungsreihe von HIV Zellkulturüberstand (Viruskonzentration bekannt) in HIV positivem Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) kann im Idealfall zur Erstellung einer Eichkurve für unbekannte Patientenproben dienen. Mit Hilfe einer solchen Eichkurve könnte die Viruslast in unbekanntenen Proben semiquantitativ mit Hilfe des CT in der PCR abgeschätzt werden.

Es wurden ebenfalls Versuche unternommen die RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial zu bestimmen. Hierfür wurde Serum und Plasma HIV positiver Patienten mit einer zu erwartenden Viruslast >1.000 Viren/ml in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingesetzt.

Nach Inkubation der Viren mit der festen Phase sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch mehrere Waschschrte abgereichert werden. Anschließend wurde das Virus mit Lysispuffer lysiert, die RT des Virus wurde freigesetzt und in den RT-Schritt des PERT-Assays eingebracht.

Um die Vorteile des entwickelten Aufreinigungsverfahrens herauszuarbeiten, wurde in weiteren Experimenten der Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay mit dem bloßen Herausverdünnen der Hemmstoffe aus dem Reaktionsansatz verglichen.

3.4.4.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Als Virusquelle stand Zellkulturüberstand von MvP 899 zur Verfügung. In R10-Puffer wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Die Proben waren frei von Plasmahemmstoffen des PERT-Assays. Es sollte untersucht werden, ob mit dem vorangeschalteten Aufreinigungsverfahren RT-Aktivität mit dem PERT-Assay nachweisbar ist. Die Sensitivität des Verfahrens konnte so unter optimierten Bedingungen untersucht werden.

MvP 899 Überstand 500 μ l	10^0	Ca. 10^8 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-1}	Ca. 10^7 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-2}	Ca. 10^6 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-3}	Ca. 10^5 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-4}	Ca. 10^4 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-5}	Ca. 10^3 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-6}	Ca. 10^2 Viren/ml
450 μ l R10 Puffer	10^{-7}	Ca. 10^1 Viren/ml
Eingesetztes Volumen in das Aufreinigungsverfahren: 450 μ l		

Tabelle 3.28: Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in R10-Puffer

Um die Auswirkungen unspezifischer Serumhemmstoffe auf das Aufreinigungsverfahren abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe von MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Spenderserum angelegt. Es wurde untersucht, ob RT-Aktivität mit Hilfe des PERT-Assays in diesem Versuchsansatz nachweisbar ist. Es konnte in diesem Versuchsaufbau untersucht werden, inwieweit Serumhemmstoffe durch das Aufreinigungsverfahren entfernt wurden bzw. noch Einfluss auf die Messung der RT-Aktivität im PERT-Assay hatten.

MvP 899 Überstand 500 μ l	10^0	Ca. 10^8 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-1}	Ca. 10^7 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-2}	Ca. 10^6 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-3}	Ca. 10^5 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-4}	Ca. 10^4 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-5}	Ca. 10^3 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-6}	Ca. 10^2 Viren/ml
450 μ l Serum	10^{-7}	Ca. 10^1 Viren/ml
Eingesetztes Volumen in das Aufreinigungsverfahren: 450 μ l		

Tabelle 3.29: Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in HIV negativem Serum

In einem weiteren Schritt wurden die Bedingungen in Patientenmaterial weitmöglichst simuliert. HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) enthält unspezifische und spezifische Hemmstoffe des PERT-Assays. Um die Auswirkungen spezifischer

und unspezifischer Plasmainhibitoren nach Durchlaufen des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays auf den PERT-Assay zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe von MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positiven Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) angelegt. Es konnte untersucht werden ob und mit welcher Sensitivität eine RT-Aktivität im untersuchten Material nachweisbar war.

MvP 899 Überstand 500 μ l	10^0	Ca. 10^8 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-1}	Ca. 10^7 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-2}	Ca. 10^6 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-3}	Ca. 10^5 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-4}	Ca. 10^4 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-5}	Ca. 10^3 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-6}	Ca. 10^2 Viren/ml
450 μ l Plasma	10^{-7}	Ca. 10^1 Viren/ml

Eingesetztes Volumen: 450 μ l

Tabelle 3.30: Verdünnungsreihe: MvP 899 Überstand in HIV positivem Plasma

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich mit Hilfe des vorangeschalteten Aufreinigerungsverfahrens, Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay, eine RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial nachweisen lässt. Hierfür wurde Plasma/Serum HIV positiver Patienten (Volumen: 1000 μ l) mit einer erwarteten Viruslast >1.000 Viren/ml direkt in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzt.

3.4.4.2 Präparation der festen Phase Dynabeads Pan Mouse IgG

Dynabeads Pan Mouse IgG binden spezifisch den Fc-Teil von Antikörpern der Klasse IgG, die in Mäusen produziert wurden. Zur Vorbereitung der festen Phase wurden im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay, die Dynabeads Pan Mouse IgG mit Antikörpern (Anti-HLA-DR+DP+DQ) ge-coated.

Zur Vorbereitung wurden die Dynabeads mit einem Waschpuffer (PBS + 0,1% BSA pH 7,4) gewaschen. Nach der Waschung wurden die Dynabeads Pan Mouse IgG mit den Antikörpern inkubiert. Nach der Inkubation wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper aus dem Reaktionsansatz durch zwei Waschschrte mit PBS+0,1% BSA Puffer entfernt. Nach Waschung wurden die Dynabeads bis zur Weiterverarbeitung in 50 μ l Puffer (PBS+ 0,1% BSA Puffer) resuspendiert.

3.4.4.3 Affinitätsbindung von HIV über Antikörper Anti-HLA-DR+DP+DQ

Im Bindungsschritt des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays wurden die vorbereiteten Proben mit den präparierten Dynabeads inkubiert. Nach stattgefundenen Affinitätsbindung des Virus über HLA-DR+DP+DQ an die feste Phase, sollten Hemmstoffe des PERT-Assays durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Nach Waschung der Proben wurden,

<i>Substanz</i>	<i>Bindungskapazität / Konzentration</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Dynabeads Pan Mouse IgG	25 μl = 10^7 beads binden 0,1–1 μg IgG	50 μl	Inkubationszeit: ca. 12 h bei 4°C auf einem Rotor (10 Umdrehungen/min)
Anti-HLA-DR+DP+DQ (Pharmigen)		5 μl	in 175 μl PBS+ 0,1% BSA Puffer

Die optimale Antikörpermenge für das Coating der Dynabeads Pan Mouse IgG wurde berechnet und experimentell bestätigt

Tabelle 3.31: Protokoll: Antikörperbindung an Dynabeads Pan Mouse IgG

die an die feste Phase gebundenen Viren, lysiert und so die RT freigesetzt. Die Aktivität der so gewonnenen RT konnte dann mit dem PERT-Assay vermessen werden.

Der genaue Ablauf des Bindungsschrittes im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay wird nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

Nach Lysis und Freisetzung der RT wurden 50 μl bzw. 20 μl der Proben in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt.

Die optimale Inkubationszeit für die Affinitätsbindung wurde experimentell ermittelt. Das Volumen des Lysispuffers mit 25 μl wurde gewählt, um Volumenverluste bei Weiterverarbeitung der Proben im PERT-Assay möglichst gering zu halten.

<i>Abschnitt</i>	<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
Bindung an feste Phase	Inkubation der Probe mit gecoateten Dynabeads	Patientenplasma oder 899-Überstand in gewünschter Verdünnung	2 h bei 4°C auf einem Rotor (10 Umdrehungen/min)
	Dekantierung des Überstandes		Raumtemperatur
Waschung 3x	Dynabeads in Waschpuffer aufnehmen	200 μ l PBS 0,1% BSA	Raumtemperatur
	Dekantierung des Überstandes		Raumtemperatur
Lysierung	Freisetzung der reversen Transkriptase	60 μ l Lysispuffer (R10-Puffer + 0,2% Triton X)	30 min bei 4°C
		25 μ l Lysispuffer (R10-Puffer + 0,2% Triton X)	

Tabelle 3.32: Ablaufprotokoll: Affinitätsbindung von HIV an Dynabeads Pan Mouse IgG im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay

4 Ergebnisse

4.1 Raji-Zellmembran Assay

4.1.1 Qualitativer Nachweis von RT-Aktivität

Es wurde untersucht, ob mit dem Aufreinigungsverfahren Raji-Zellmembran Assay der Nachweis von RT-Aktivität möglich ist. Als Quelle von HIV wurde Zellkulturüberstand von MvP-899 verwendet. Nach Vorverdünnung in 0,9% NaCl (Verdünnung 1:10³ entspricht 10⁵ Viren/ml) und Inkubation mit HIV negativem Serum (Verhältnis 2:1) als Komplementquelle, wurde das Untersuchungsmaterial in drei identische Proben zu je 200 μ l (entspricht 13.000 Viren) aufgeteilt. Um die Ergebniskonsistenz zu überprüfen, wurden in den Raji-Zellmembran Assay drei identische Proben eingesetzt.

Als Negativ Kontrolle diente uninfizierter Überstand der Zelllinie H9. Die Negativ Kontrolle wurde ebenfalls mit HIV negativem Serum (Verhältnis 2:1) inkubiert und in den Raji-Zellmembran Assay eingesetzt.

Die Proben wurden nach Durchlaufen der Affinitätsbindung in 100 μ l Lysispuffer lysiert, 50 μ l des Lysats wurden in den RT-Schritt des PERT-Assays eingebracht.

In allen drei Proben ließ sich eine RT-Aktivität nachweisen. Die Negativ Kontrolle zeigte ebenfalls RT-Aktivität.

Um Verunreinigungen der Negativ Kontrolle auszuschließen, wurde dieses Experiment drei Mal wiederholt. In allen Versuchen zeigten sowohl Proben, als auch Negativ Kontrolle eine RT-Aktivität. Exemplarisch wird die Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte eines Versuches dargestellt (Abbildung 4.1).

4.1.2 Raji-Zellmembranen und endogene RT-Aktivität

Es wurde untersucht, ob Raji-Zellmembranen eine intrinsische RT-Aktivität aufweisen. Hierfür wurden Raji-Zellmembranen in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt. Um die Ergebniskonsistenz zu überprüfen, wurden 3 Proben parallel untersucht. Als Negativ Kontrolle diente der Reaktionsmix, als Positiv Kontrolle der Reaktionsmix mit hinzugefügter rekombianter reverser Transkriptase.

Die Proben mit Raji-Zellmembranen zeigten im PERT-Assay RT-Aktivität. In der Positiv Kontrolle ließ sich ebenfalls, in der Negativ Kontrolle keine RT-Aktivität nachweisen.

Raji-Zellmembranen weisen demnach eine intrinsische RT-Aktivität auf.

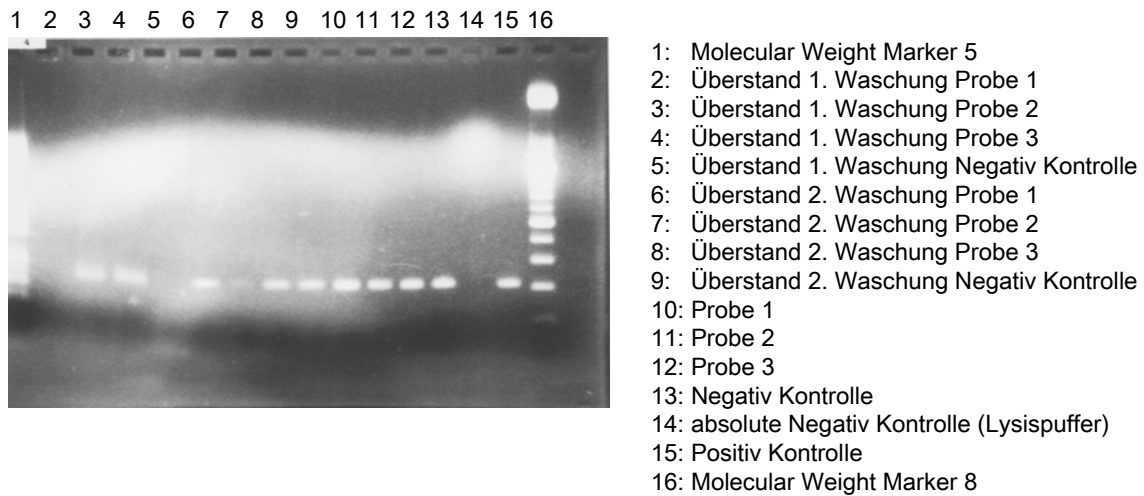


Abbildung 4.1: Agarosegel-Elektrophorese; qualitativer Nachweis von RT-Aktivität mit Raji-Zellmembranassay; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays: Pk 101 bp

4.2 Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay

4.2.1 Qualitativer Nachweis von RT-Aktivität

Zunächst wurde untersucht, ob mit diesem Affinitätsbindungsverfahren die Bindung des Virus an eine feste Phase gelingt und so der Nachweis einer RT-Aktivität möglich ist. Als Quelle für HIV wurde MvP 899 Zellkulturüberstand verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde mit Human Complement Serum als Komplementdonor (Verhältnis 2:1) versetzt. Nach Verdünnung in 0,9% NaCl wurde das Untersuchungsmaterial in zwei identische Proben zu je 200 μ l aufgesplittet (Viruslast ca. 15.000 Viren). In den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay wurden zwei identische Proben eingesetzt. Die Überstände aus den Waschschritten wurden ebenfalls in den PERT-Assay eingesetzt, um eventuelle Virusverluste durch Waschung sichtbar zu machen. Positiv und Negativ Kontrollen wurden mitgeführt.

Es ließ sich sowohl in den beiden Proben, sowie in geringerem Maße auch in den Überständen aus den Waschschritten RT-Aktivität mit dem PERT-Assay detektieren. Eine Bindung von HIV an eine feste Phase (hier: Protein-A Agarose) über Komplement C3d erscheint, trotz Waschverlusten, grundsätzlich möglich (Abbildung 4.2).

4.2.2 Bestimmung der Sensitivität: MvP 899 und Human Complement Serum

Um die Sensitivität des Verfahrens abzuschätzen, wurden Proben mit unterschiedlicher Viruskonzentration in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzt.

MvP-899 Zellkulturüberstand wurde mit Human Serum Complement als Komplement-

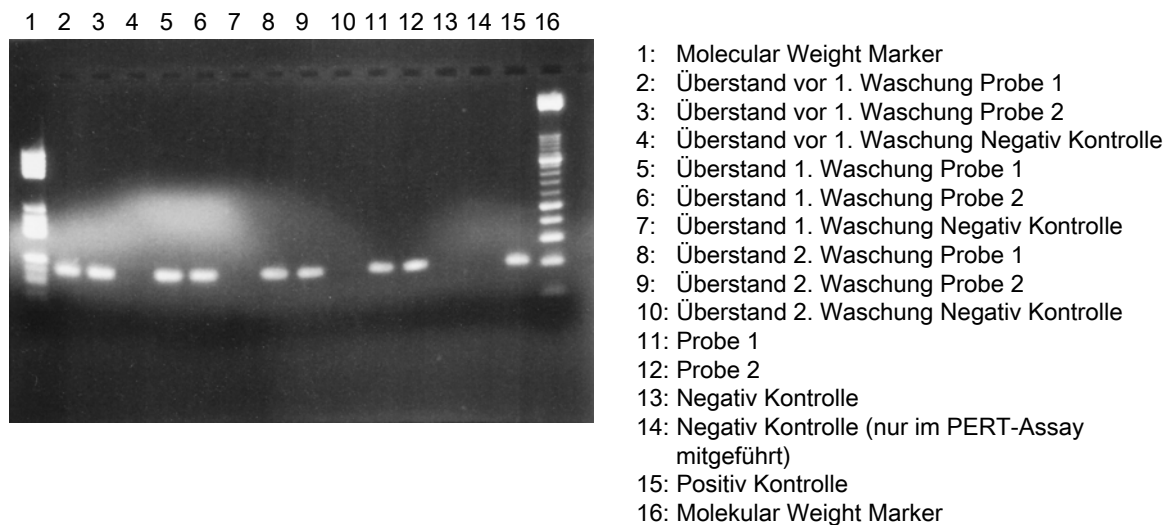


Abbildung 4.2: Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp, Viruslast 15.000 Viren

donor inkubiert (Verhältnis 2:1). Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl angelegt. Es wurden drei Proben zu je 200 μl in den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay eingebracht. Probe 1 enthielt ca. 15.000 Viren, Probe 2 ca. 1.500 Viren und Probe 3 ca. 150 Viren. Die Überstände aus den Waschsritten des Bindungsassays wurden ebenfalls in den PERT-Assay eingesetzt, um Virusverluste durch Waschung sichtbar zu machen. Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden mitgeführt. Probe 2 und Probe 3 erzeugten in der Chemolumineszenzmessung ein deutliches Signal, Probe 1 mit der größten Viruslast nicht. Dieses Phänomen ließ sich dadurch erklären, dass während der 2. Waschung die Protein-A Agarose der Probe 1 dekantiert wurde. Dementsprechend ließ sich im Überstand der 2. Waschung der Probe 1 ein deutliches Signal detektieren. Die Agarosegel-Elektrophorese bestätigte die Ergebnisse (Abbildung 4.3).

In diesem Versuch konnte eine RT-Aktivität bis zu einer Viruseinsaat von 150 Viren mit dem Bindungsassay nachgewiesen werden. Da die Viren mit 100 μl Lysispuffer lysiert wurden und davon nur 50 μl in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt wurden, lag die in den PERT-Assay eingebrachte Virusmenge bei 75 Viren.

Das Ergebnis des Versuchs zeigte eine hohe Sensitivität. Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, dass in Wiederholungsversuchen diese hohe Sensitivität nicht bestätigt werden konnte. Im Mittel lag die Sensitivität des Testes bei ca. 15.000 in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzten Viren.

Zudem muß darauf hingewiesen werden, dass durch Anlegen der Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl mögliche Hemmstoffe des PERT-Assays ebenfalls herausverdünnt wurden.

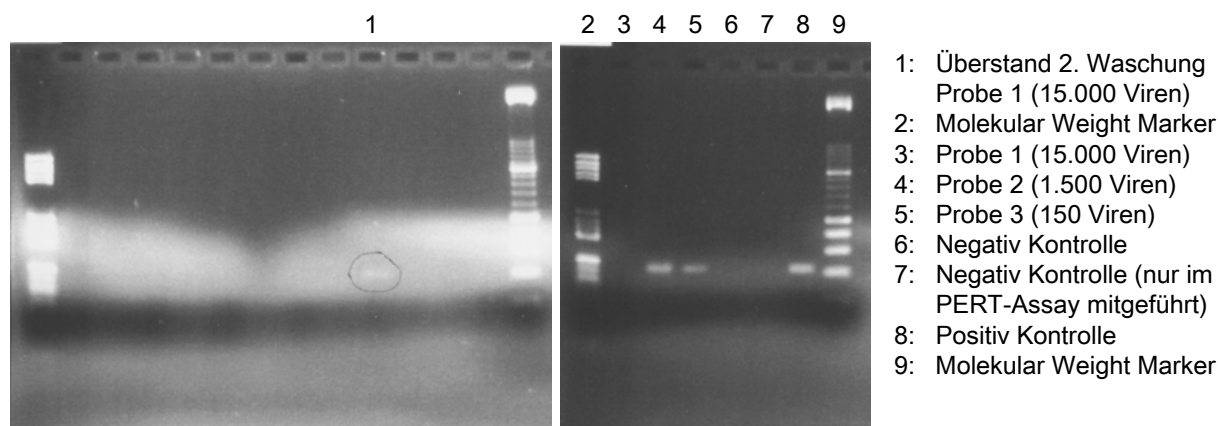


Abbildung 4.3: Agarosegel Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität des Verfahrens in Human Complement Serum; Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

4.2.3 Bestimmung der Sensitivität: MvP 899 in unterschiedlichen Trägermedien

In diesen Experimenten wurde der Einfluß unterschiedlich aufbereiteter HIV negativer Seren auf den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay untersucht. Hierfür wurde MvP 899 Zellkulturüberstand in unterschiedliche Seren als Komplementdonoren eingespickt (Verhältnis 2:1). HIV Zellkulturüberstand wurde in Human Complement Serum, Serum eines HIV negativen Spenders und in „heat inactivated Serum“ eines HIV negativen Spenders eingesät. Zur Hitzeinaktivierung wurde das Serum 30 min im Wasserbad bei 56°C erhitzt. Dadurch sollte das Komplementsystem inaktiviert werden.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl angelegt. 500 µl jeder Probe wurden in den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay eingesetzt (Tabelle 4.1).

Nach Durchlaufen des Affinitätsbindungsverfahrens wurden die Proben in 100 µl Lysis-puffer inaktiviert und 50 µl des Lysats in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt.

Der Nachweis von RT-Aktivität nach Einsatz von HIV in Human Complement Serum und in heat inactivated Serum gelang bis zu einer Virusmenge von 375.000 Viren. In HIV negativen Serum ließ sich RT-Aktivität bis zu einer Virusmenge von 3.750 Viren nachweisen (Abbildung 4.4).

Eine Viruskonzentration von 10⁴ Viren/ml in einer Verdünnungsreihe mit 0,9% NaCl, schien in der Zusammenschau aller Versuche zur Affinitätsbindung im Mittel die untere Nachweisgrenze des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays widerzuspiegeln.

4.2.4 Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenplasma

Es wurde untersucht, ob sich mit dem Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay RT-Aktivität direkt aus Patientenplasma nachweisen lässt. Es wurden Plasmen mit ausreichend

<i>Serum</i>	<i>2. log Stufe</i>	<i>4. log Stufe</i>	<i>6. log Stufe</i>	<i>8. log Stufe</i>
Human Complement Serum	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
	375000 Viren	3750 Viren	37,5 Viren	0 Viren
Serum Proband HIV Negativ	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
	375000 Viren	3750 Viren	37,5 Viren	0 Viren
Heat inactivated Serum Proband HIV negativ	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12
	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
	375000 Viren	3750 Viren	37,5 Viren	0 Viren

Tabelle 4.1: Verdünnungsreihe der Proben in 0,9% NaCl Lösung, Darstellung der Viruslast, der in Komplement-Agarose-Bindungsassay eingebrachten Proben

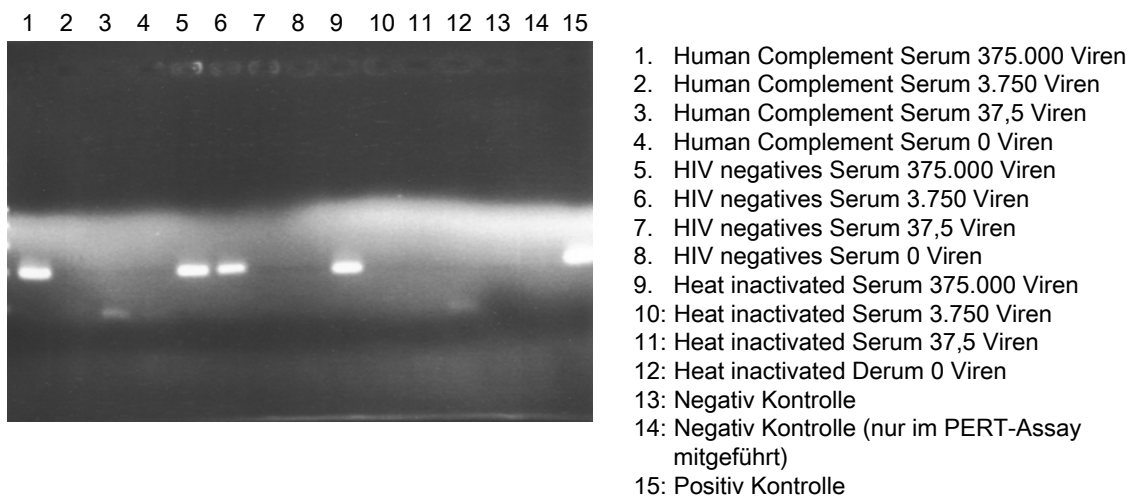


Abbildung 4.4: Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität des Verfahrens in verschiedenen Trägermedien; Nachweis spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Virusmenge</i>	<i>Crossing Point</i>
Probe 1	Patientenplasma 1	ca. 20000	39,84
Probe 2	Patientenplasma 1 + Komplement	ca. 13300	52,85
Probe 3	Patientenplasma 2	ca. 2000	42,12
Probe 4	Patientenplasma 2 + Komplement	ca. 1300	39,64
Probe 5	899 + Komplement 3. Verd. in 0,9 NaCl	ca. 15000	29,49
Probe neg.	H9 + Komplement		52,34
Negativ Kontrolle	Lysispuffer direkt in PERT		40,15
Positiv Kontrolle	899- Überstand direkt in PERT	ca. 3500	35,24

Tabelle 4.2: Real Time PCR Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: Vermessung von Patientenmaterial auf RT-Aktivität

hoher Viruslast ausgewählt. Plasma 1 wies eine Viruslast > 100.000 Viren/ml, Plasma 2 eine Viruslast > 10.000 Viren/ml auf. Die Plasmen wurden direkt und nach Inkubation mit Human Complement Serum (Verhältnis 2:1), in das Aufreinigungsverfahren eingesetzt. Durch den Zusatz von externen Komplementfaktoren sollte untersucht werden, ob sich so die Bindungskapazität des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays erhöhen lässt. Das Volumen der eingesetzten Proben betrug $200 \mu\text{l}$. Der PCR-Schritt des PERT-Assays wurde als Real-Time-PCR durchgeführt (Tabelle 4.2). Zur Kontrolle des PCR-Produktes wurde eine Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte und eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

Als Virusmenge wurde diejenige Anzahl an Viren bezeichnet, die in das Aufreinigungsverfahren eingesetzt wurde. Da die Viren in $100 \mu\text{l}$ Lysispuffer lysiert und nur $50 \mu\text{l}$ des Lysats in den PERT-Assay eingesetzt wurden reduziert sich die, in den PERT-Assay eingesetzte Virusmenge um den Faktor 2.

Sowohl in Plasma 1, wie auch in Plasma 2 ließ sich eine RT-Aktivität nachweisen (Tabelle 4.2). Die Schmelzpunktanalyse wies die PCR-Produkte der Negativ Kontrollen als unspezifisch aus. Dies wurde auch durch die Agarosegel-Elektrophorese bestätigt (Abbildung 4.5).

Es gelang mit diesem Versuchsaufbau RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial mit dem PERT-Assay nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte nur qualitativ. Die vorherige Inkubation mit Human Complement Serum schien keinen zusätzlichen positiven Einfluß auf das Affinitätsbindungsverfahren zu besitzen.

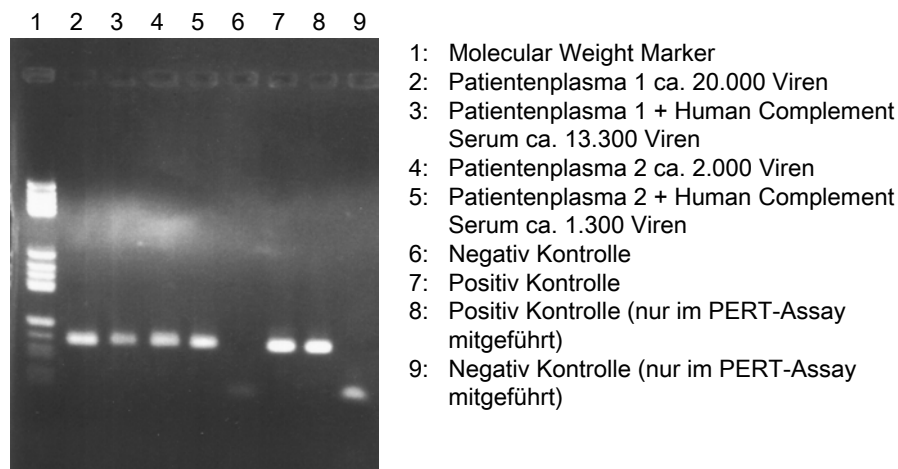


Abbildung 4.5: Agarosegel-Elektrophorese Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay: spezifisches PCR-Produkt des PERT- Assays Pk 101 bp aus Patientenmaterial

4.3 Anti-HLA-DR Bindungsassay

4.3.1 Anti-HLA-DR Bindungsassay mit Protein-A Agarose

Zunächst wurde untersucht, ob eine Affinitätsbindung von HIV über HLA-DR möglich ist. Hierfür wurde MvP 899 Zellkulturüberstand verwendet. Um die Sensitivität des Verfahrens in Abwesenheit von Hemmstoffen des PERT-Assays abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl in 10er Verdünnungsstufen angelegt. In das Aufreinigungsverfahren wurden je 450 μ l Probenvolumen eingesetzt. Nach der Affinitätsbindung wurden die Proben mit 100 μ l Lysispuffer lysiert, 50 μ l wurden in den RT-Schritt des PERT-Assays eingebracht. Die niedrigste, mit dem PERT-Assay detektierbare Virusmenge bei 22.500 Viren (Abbildung 4.6).

4.3.2 Anti-HLA-DR Bindungsassay: Dynabeads Pan Mouse IgG als feste Phase

4.3.2.1 Nachweisgrenze ohne Plasmahemmstoffe des PERT-Assays

Zunächst wurde die untere Nachweisgrenze des PERT-Assays für RT-Aktivität mit vorangeschalteten Affinitätsbindungsverfahren, in Abwesenheit von Plasmahemmstoffen, ermittelt. Hierfür wurde MvP 899 Zellkulturüberstand in 0,9% NaCl verdünnt. Es wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen angelegt. In das Aufreinigungsverfahren wurde je 450 μ l Probenvolumen eingesetzt. Nach der Affinitätsbindung wurden die Proben in 60 μ l Lysispuffer inaktiviert. 50 μ l des Lysats wurden in den RT-Schritt des PERT-Assays eingebracht.

Exemplarisch werden die Ergebnisse eines Experiments werden zunächst in tabellarischer

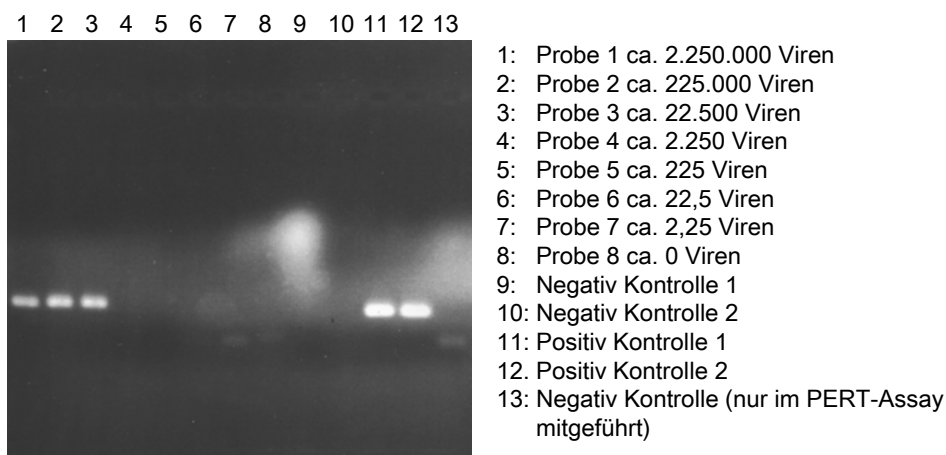


Abbildung 4.6: Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR Bindungsassay: Protein-A Agarose als feste Phase, Bestimmung der Sensitivität in 0,9% NaCl, spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

Form dargestellt (Tabelle 4.3).

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Cycle Threshold</i>
Probe 1	MvP 899 375000 Viren	33,70
Probe 2	MvP 899 37500 Viren	36,03
Probe 3	MvP 899 3750 Viren	39,55
Probe 4	MvP 899 375 Viren	>51,00
Probe 5	MvP 899 37,5 Viren	>51,00
Probe negativ	H9-Überstand 1. Verdünnungsstufe	>51,00
Negativ Kontrolle	Lysispuffer direkt in PERT	>51,00
Positiv Kontrolle	MvP 899 333000 Viren direkt in PERT	32,91

Tabelle 4.3: Real Time PCR Anti-HLA-DR Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität in 0,9% NaCl, Darstellung des CT

Der Nachweis einer RT-Aktivität gelang mit dem entwickelten Affinitätsbindungsverfahren bis zu einer Verdünnung von 10^4 Viren/ml. Das entsprach einer Viruslast von 3.750 Viren (Tabelle 4.3).

Da sich die PCR-Produkte nach jedem Zyklus theoretisch verdoppeln, müsste der CT der einzelnen Proben theoretisch einen Abstand von 3,3 Zyklen aufweisen. Dieser theoretische Wert stimmt mit dem tatsächlichen Wert gut überein.

<i>Virusmenge</i>	<i>spezifisches PCR Produkt in Gel-Elektrophorese</i>
3.000.000 Viren	nachweisbar
300.000 Viren	nachweisbar
30.000 Viren	nachweisbar
3.000 Viren	nicht nachweisbar
300 Viren	nicht nachweisbar

Tabelle 4.4: Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma

4.4 Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay

Der Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay ist ein weiteres im Rahmen dieser Dissertation entwickeltes Verfahren zur Affinitätsbindung von HIV. In einem ersten Schritt wurde MvP 899 Zellkulturüberstand in verschiedene Trägermedien eingespeist und überprüft, ob in diesen Trägermedien eine Bindung des Virus möglich ist. Der Nachweis der RT-Aktivität erfolgte mit dem PERT-Assay. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob mit diesem Verfahren der Nachweis von RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial möglich ist. Im folgenden werden exemplarisch die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

4.4.1 Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma

In diesem Versuchsaufbau wurde untersucht, ob mit dem Affinitätsbindungsverfahren Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay der Nachweis einer RT-Aktivität in HIV positivem Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) möglich ist. HIV positives Plasma enthält unspezifische und spezifische Hemmstoffe des PERT-Assays.

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in 0,9% NaCl vorverdünnt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen angelegt. 300 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden in 700 μ l HIV positives Plasma eingespeist. Das gesamte Volumen (1000 μ l) wurde in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingebracht. Nach den Waschschritten wurden die Proben in 60 μ l Lysispuffer lysiert. 50 μ l wurden in den RT-Schritt des PERT-Assays eingebracht. Das PCR-Produkt wurde mit einer Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

Die Auswertung des Versuchs erfolgte qualitativ. Die untere Nachweisgrenze für RT-Aktivität in HIV positiven Spenderplasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) lag bei 30.000 in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzten Viren (Tabelle 4.4, Abbildung 4.7).

4.4.2 Nachweis von RT-Aktivität in HIV negativen Serum

In diesen Versuchen wurde das Verhalten der RT-Aktivität in HIV negativen Spenderserum untersucht. Hierfür wurde aus MvP 899 Zellkulturüberstand eine Verdünnungsreihe in HIV

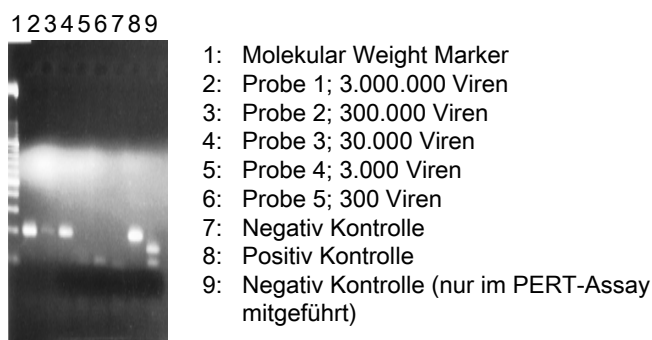


Abbildung 4.7: Agarosegel-Elektrophorese Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

negativen Spenderserum angelegt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich innerhalb der Verdünnungsreihe eine semiquantitative Eichkurve der RT-Aktivität erstellen lässt. Die Grundlage zur Erstellung der Eichkurve bildet der CT. Im PCR-Schritt des PERT-Assays wird ein definiertes PCR-Produkt generiert. Der CT ist abhängig von der Menge der in die PCR Reaktion eingesetzten cDNA (aus dem RT-Schritt des PERT-Assays). Die in den Test eingesetzten Virusmengen nahmen in jedem Verdünnungsschritt um eine 10er Potenz ab. Da sich die PCR-Produkte nach jedem Zyklus theoretisch verdoppeln, müßte der CT der einzelnen Proben theoretisch einen Abstand von 3,3 Zyklen aufweisen. Auf diese Weise könnte also eine Eichkurve konstruiert werden.

450 μ l der zu analysierenden Verdünnungsstufen wurden in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingebracht. Serum enthält unspezifische Hemmstoffe des PERT-Assays, diese sollten durch das Affinitätsbindungsverfahren abgereichert werden. Nach den Waschschritten wurden die Viren mit 60 μ l Lysispuffer lysiert, 50 μ l wurden in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt. Der PCR-Schritt wurde als Real Time PCR durchgeführt (Tabelle 4.5, Abbildung 4.8).

In diesem Versuch wurde H9 Überstand (Überstand der uninfizierten Zelllinie H9) als Negativ Kontrolle das gesamte Testverfahren mitgeführt. In der LightCycler Messung (Fluorophor: SYBR- Dye Green I) ließ sich ein Fluoreszenzsignal detektieren, die Schmelzpunktanalyse wies die entstandenen PCR-Produkte als unspezifisch aus.

Wie in Tabelle 4.5 und Abbildung 4.8 dargestellt, erreichte unverdünnter MvP 899 Zellkulturüberstand den Cut Off der Messung nach 22,88 Zyklen. Die Probe in Serum, deren Viruslast eine 10er Potenz geringer war, nach 30,16 Zyklen. Theoretisch sollten die beiden Proben einen Abstand von ca. 3,3 Zyklen aufweisen. Tatsächlich wiesen sie einen Abstand von 7,28 Zyklen auf. Dieses Ergebnis kann damit erklärt werden, dass trotz des Aufreinigungsverfahrens über Affinitätsbindung noch unspezifische Serumhemmstoffe des PERT-Assays in der Probe aktiv sind, diese also nicht vollständig entfernt wurden.

Die weiteren Zyklenabstände bis zum Erreichen des CT zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen entsprachen im Rahmen der Messgenauigkeit den erwarteten 3,3 Zyklen.

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	MvP 899 unverdünnt 45.000.000 Viren	22,88
Probe 2	MvP 899 in Serum 4.500.000 Viren	30,16
Probe 3	MvP 899 in Serum 450.000 Viren	32,05
Probe 4	MvP 899 in Serum 45.000 Viren	36,08
Probe 5	MvP 899 in Serum 4.500 Viren	39,63
Probe 6	MvP 899 in Serum 450 Viren	45,46
Probe 7	MvP 899 in Serum 45 Viren	
Probe 8	MvP 899 in Serum 4,5 Viren	
Probe neg.	H9- Zellkulturüberstand	49,01
Positiv Kontrolle	899-Überstand	22,86
Negativ Kontrolle	Lysispuffer	

Tabelle 4.5: Real Time PCR Anti HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der Sensitivität in HIV negativen Serum durch Messung des CT

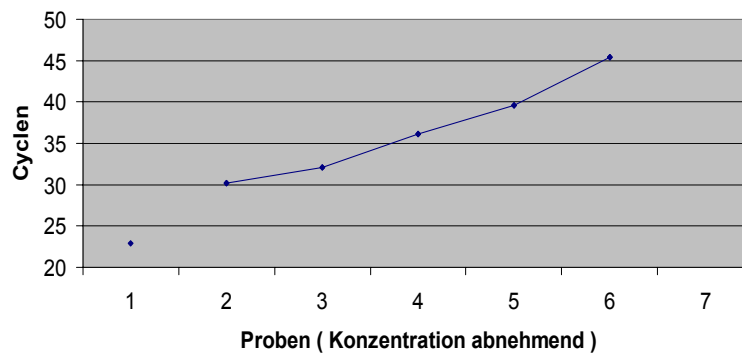


Abbildung 4.8: Anti-HLA DR+DP+DQ Bindungsassay: Eichkurve anhand des CT in HIV negativen Serum

Dies deutet daraufhin, dass der PERT-Assay in jeder Probe in gleichem Ausmaß gehemmt wurde.

Die Ergebnisse dieses Versuches konnten durch zahlreiche Wiederholungsuntersuchungen bestätigt werden.

4.4.3 Nachweis von RT-Aktivität im Blut HIV-positiver Patienten

Blut HIV positiver Patienten mit einer erwarteten Viruslast >1000 Viren/ml wurde auf RT-Aktivität untersucht. Mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay und PERT-Assay sollte der Nachweis einer RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial erfolgen. Es wurde, wenn möglich Plasma und Serum HIV positiver Patienten untersucht, um herauszufinden welche Blutpräparation für das Verfahren besser geeignet ist.

4.4.3.1 Nachweis von RT-Aktivität im Plasma HIV-positiver Patienten

Mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays und dem PERT-Assays wurden 23 Patientenplasmen mit einer erwarteten Viruslast von > 1000 Viren/ml auf RT-Aktivität hin vermessen. In 11 Fällen konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. 2 Plasmen waren fraglich positiv. Das heißt, in der Real Time PCR erreichten sie den CT nicht, in der Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte war aber eine spezifische Bande nachweisbar. In 10 Patientenplasmen war weder mit der Real Time PCR noch mit der Agarosegel-Elektrophorese ein spezifisches Signal detektierbar.

Es wurde demonstriert, dass es grundsätzlich möglich ist, mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay und dem PERT-Assay direkt aus Patientenplasma eine RT-Aktivität nachzuweisen.

Exemplarisch wird die Auswertung eines Versuchs zum Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial in tabellarischer Form dargestellt (Tabelle 4.6, Abbildung 4.9).

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	Patientenplasma 7102 1.000 μ l	38,26
Probe 2	Patientenplasma 7043 1.000 μ l	39,77
Probe positiv	899-Überstand	23,36
Probe negativ	H9-Überstand	
Positiv Kontrolle	899-Überstand	23,98
Negativ Kontrolle	Lysispuffer	

Tabelle 4.6: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung von RT-Aktivität im Plasma HIV postiver Patienten

4.4.3.2 Nachweis von RT-Aktivität im Serum HIV-positiver Patienten

Serum HIV positiver Patienten wurde mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays und dem PERT-Assay auf RT-Aktivität hin untersucht. Insgesamt wurden 7 Patientenseren

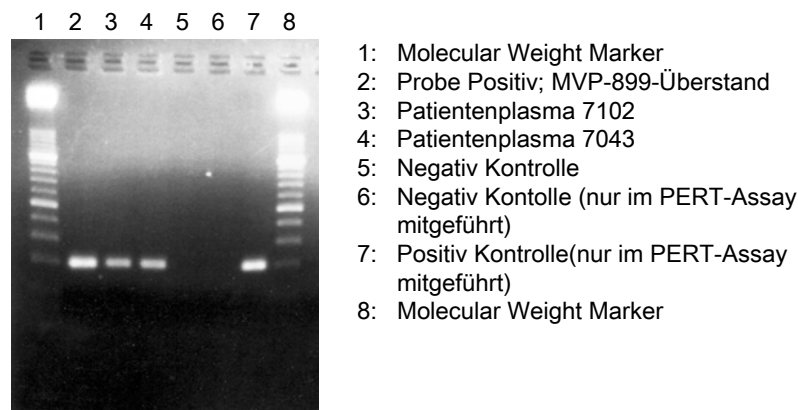


Abbildung 4.9: Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung von RT-Aktivität im Plasma HIV positiver Patienten; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

mit einer erwarteten Viruslast von > 1000 Viren/ml vermessen. In 3 Fällen konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. 1 Serum war fraglich positiv. Das heißt, in der Real Time PCR erreichte es den CT nicht, in der Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte ließ sich eine spezifische Bande nachweisen. In 3 Patientenseren war weder in der Real Time PCR noch in der Agarosegel-Elektrophorese ein spezifisches Signal detektierbar.

Die Versuche zeigen, dass es durch das entwickelte Affinitätsbindungsverfahren, Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay, grundsätzlich möglich ist, RT-Aktivität direkt aus Patientenserum mit dem PERT-Assay nachzuweisen.

Exemplarisch wird nun in tabellarischer Form ein Versuch zur Vermessung der RT-Aktivität von Serum/Plasma Paaren dargestellt (Tabelle 4.7, Abbildung 4.10).

In den hier analysierten Serum/Plasma Paaren konnte in beiden Plasmen, jedoch nur im Serum von Patient 1 eine RT-Aktivität nachgewiesen werden.

4.4.4 Optimierungsversuche

4.4.4.1 Optimierung der Antigen-Antikörper Inkubationszeit im Bindungsschritt des Anti-HLA-DR+DP+DQ- Bindungsassays

Die optimale Inkubationszeit für die Antigen (HLA 2 Proteine auf HIV) und Antikörper (Anti HLA-DR+DP+DQ) wurde experimentell ermittelt.

Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von MvP-899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum angelegt. $450 \mu\text{l}$ wurden in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingesetzt und mit dem PERT-Assay vermessen. Die Inkubationszeit der Antigen-Antikörper Bindung wurde in der 2. Verdünnungsstufe (450.000 Viren) von 30 min bis zu 180 min variiert.

Die Ergebnisse des Versuchs werden in Tabelle 4.8 dargestellt.

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	MvP 899 in HIV neg. Serum 450.000 Viren	28,96
Probe 2	MvP 899 in HIV neg. Serum 4.500 Viren	34,87
Probe 3	MvP 899 in HIV neg. Serum 45 Viren	
Probe 4	MvP 899 in HIV neg. Serum 0 Viren	
Probe 5	Plasma Patient 1 1.000 μ l	33,36
Probe 6	Serum Patient 1 1.000 μ l	35,5
Probe 7	Plasma Patient 2 1.000 μ l	37,23
Probe 8	Serum Patient 2 1.000 μ l	
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 1	
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 2	
Negativ Kontrolle	Lysispuffer	
Positiv Kontrolle	899-Überstand	20,74
Positiv nach RT	Bekanntes RT- Produkt	22,63

Tabelle 4.7: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität in Serum/Plasma HIV positiver Patienten

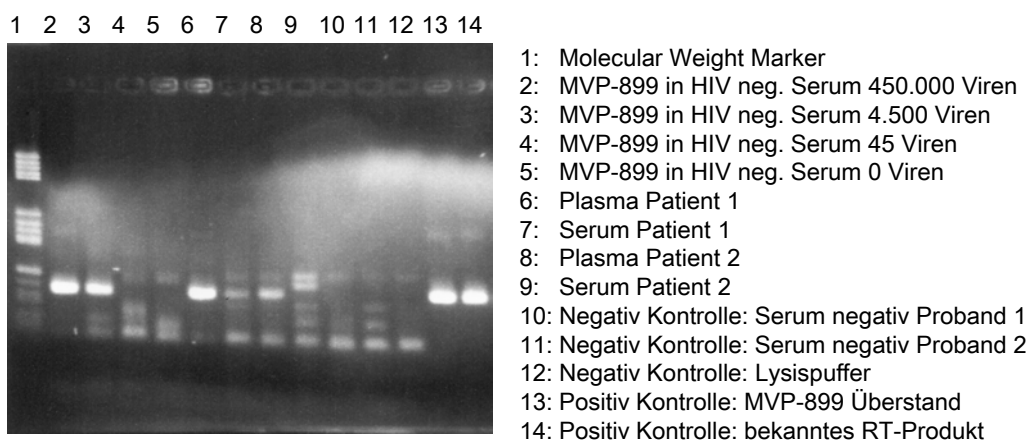


Abbildung 4.10: Agarosegel-Elektrophorese Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität in Serum/Plasma HIV positiver Patienten; spezifisches PCR-Produkt des PERT-Assays Pk 101 bp

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Inkubationszeit</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	MvP 899 unverdünnt 450 μ l	90 min	17,22
Probe 2	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	90 min	30,8
Probe 3	MvP 899 4. Verd. 4500 Viren	90 min	34,85
Probe 4	MvP 899 6. Verd. 45 Viren	90 min	
Probe 5	MvP 899 8. Verd. 0 Viren	90 min	
Probe 6	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	30 min	31,75
Probe 7	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	60 min	30,51
Probe 8	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	120 min	30,27
Probe 9	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	150 min	31,76
Probe 10	MvP 899 2. Verd. 450000 Viren	180 min	31,24
Probe 11	Serum Patient 1 1000 μ l	90 min	
Probe 12	Plasma Patient 1 1000 μ l	90 min	
Negativ Kontrolle	Serum Proband 1	90 min	
Negativ Kontrolle	Serum Proband 2	90 min	
Negativ Kontrolle	Lysispuffer		
Positiv Kontrolle	899-Überstand		22,63

Tabelle 4.8: Optimierungsversuch Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Variation der Antigen-Antikörper Inkubationszeit

Anhand des CTs konnte die optimale Inkubationszeit abgeschätzt werden. In den verglichenen Proben wurde die gleiche Virusmenge eingespickt, d. h. je früher der CT erreicht wurde, desto intensiver die Antikörper-Antigen Bindung. Der CT unterschied sich in den untersuchten Proben nicht wesentlich, tendenziell schien die optimale Inkubationszeit für die Antigen-Antikörper Bindung zwischen 60 und 120 min zu liegen.

In diesem Versuch wurde zusätzlich ein Serum/Plasma Paar eines HIV positiven Patienten untersucht (erwartete Viruslast >1000 Viren/ml). Eine reverse Transkriptase Aktivität konnte nicht gemessen werden.

4.4.4.2 Optimierung der Waschschrte im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay

Im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay wurde HIV über Antikörper gegen HLA 2 Proteine an eine feste Phase gebunden. Nach Bindung an die feste Phase sollte durch Waschung mit PBS + 0,1% BSA Puffer eine Abreicherung von Plasmahemmstoffen erfolgen. Durch Waschung wurden Plasmahemmstoffe des PERT-Assays abgereichert, allerdings gingen mit jedem Waschschrte auch Viren aus der Bindung verloren (Vorversuche, Ergebnisse werden nicht dargestellt). Die optimale Anzahl an Waschungen sollte experimentell ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe von MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positiven Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) angelegt. Die 3., die 4. und die 5. Verdünnungsstufe (Volumen jeweils 450 μ l) wurden in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingebracht und mit einer unterschiedlichen Anzahl an Waschschritten aufgereinigt. Zur Messung der RT-Aktivität wurde mit dem PERT-Assay der CT bestimmt. Dabei bedeutet, je früher eine Probe den CT erreicht, desto effektiver wurden die Hemmstoffe entfernt.

<i>Waschstufe: Anzahl der Waschungen</i>	<i>3. Verdünnungs- stufe 45000 Viren</i>	<i>4. Verdünnungs- stufe 4500 Viren</i>	<i>5. Verdünnungs- stufe 450 Viren</i>
1 Waschung	32,97 Cyclen	34,50 Cyclen	38,42 Cyclen
2 Waschungen	33,26 Cyclen	34,78 Cyclen	
3 Waschungen	29,78 Cyclen	33,18 Cyclen	
4 Waschungen	30,75 Cyclen	33,23 Cyclen	34,33 Cyclen
5 Waschungen	30,36 Cyclen	34,39 Cyclen	34,23 Cyclen

Tabelle 4.9: Optimierungsversuch Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: CT in Abhängigkeit der Anzahl der Waschschrte

Bei Waschstufe 1 und 2 erreichte die 3. Verdünnungsstufe (45.000 Viren) den CT nach ca. 33 Zyklen, ab Waschstufe 3 nach ca. 30 Zyklen. Das bedeutete, dass Hemmstoffe den PERT-Assay in Waschstufe 1 und 2 noch ca. 10 mal so stark beeinflussen wie in Waschstufe 3.

Waschstufe 4 und 5 schienen keine Verbesserung zu erbringen. Im Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay wurden deshalb nach der Immobilisation von HIV an der festen Phase, 3 Waschungen mit PBS+0,1% BSA-Puffer durchgeführt, um Plasmahemmstoffe abzureichern (Tabelle 4.9).

4.4.5 Vergleich Affinitätsbindungs- versus Verdünnungsverfahren

Ziel des entwickelten Affinitätsbindungsverfahrens von HIV war der Nachweis von RT-Aktivität aus Serum/Plasma HIV-positiver Patienten mit dem PERT-Assay. Serum und Plasma enthalten Hemmstoffe des PERT-Assays, die dessen Effektivität einschränken. In dem folgenden Abschnitt der Arbeit soll das, im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Affinitätsbindungsverfahren, mit dem Herausverdünnen der Hemmstoffe aus Proben verglichen werden. Im Affinitätsbindungsverfahren Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay wurden Serum-/Plasmahemmstoffe durch Bindung des Virus an eine feste Phase und konsequente Waschschritte aus dem Reaktionsansatz entfernt. Auf diese Weise konnte der Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial erfolgen. Eine bisher gebräuchliche Methode war das Herausverdünnen der Hemmstoffe des PERT-Assays in einem Verdünnungspuffer (R10-Puffer). Im folgenden Abschnitt werden diese beiden Methoden verglichen und die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchungen präsentiert.

Für diese Vergleichsuntersuchungen wurde MvP 899 Zellkulturüberstand (Ausgangskonzentration 10^8 Viren/ml) in Serum/Plasma eingespeist. Daraus wurden zwei identische Aliquots mit gleicher Viruslast gebildet. In diesen Aliquots sollte die RT-Aktivität bestimmt werden.

Ein Aliquot (500 μ l) wurde in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingesetzt. Die Inkubationszeit zur Virusbindung an die feste Phase betrug 90 min, anschließend wurden 3 Waschschritte, zur Abreicherung der Serum-/Plasmahemmstoffe, mit Waschpuffer (PBS + 0,1% BSA) durchgeführt. Nach Lysis des Virus mit 30 μ l Lysispuffer wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen in R10-Puffer angelegt. Anschließend wurde die RT-Aktivität der einzelnen Verdünnungsstufen bestimmt.

Lysispuffer mit RT: 30 μ l 10^0	R10- Puffer 27 μ l 10^{-1}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-2}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-3}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-4}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-5}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-6}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-7}	R10- Puffer 27 μ l 10^{-8}
--	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabelle 4.10: Ansatz 1: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay; Verdünnungsreihe der Proben nach Durchlaufen des Affinitätsbindungsverfahrens in R10-Puffer

Aus dem zweiten Aliquot (Volumen 500 μ l) sollte ebenfalls die RT-Aktivität bestimmt werden. Es wurden 15 μ l des Aliquots mit 15 μ l Lysispuffer inaktiviert, anschließend wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen in R10-Puffer angelegt. Das heißt hier wurden Inhibitoren des PERT-Assays herausverdünnt. Die RT-Aktivität der einzelnen Verdünnungsstufen wurde bestimmt.

15 μ l Virus/Trägermedium + 15 μ l Lysis-puffer: 30 μ l RT enthaltendes Material	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l	R10-Puffer 27 μ l
10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	

Tabelle 4.11: Ansatz 2: „Herausverdünnen der Hemmstoffe“; Verdünnungsreihe der Proben in R10-Puffer

In den RT-Schritt des PERT-Assays wurden jeweils 20 μ l RT enthaltendes Material eingesetzt. Die Vervielfältigung der im RT-Schritt entstandenen cDNA wurde als Real Time PCR durchgeführt. Es wurde der CT bestimmt. Als Bestätigungstest wurde eine Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt. In den folgenden Untersuchungen wurde dieser Versuchsaufbau beibehalten. Dieses Experiment wurde in HIV negativem Serum, HIV positivem Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) und „heat inactivated“ Serum durchgeführt. Auch das Verhältnis HIV-Zellkulturüberstand MvP 899 zu Trägermedium wurde variiert.

4.4.5.1 MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum: Verhältnis 1 : 9

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde im Verhältnis 1 : 9 in HIV negatives Serum eingespeist. Es wurden zwei Aliquots mit einer Viruslast von 5×10^6 Viren gebildet. Um die Auswirkungen des Affinitätsbindungsverfahrens mit dem Standardverdünnungsverfahren zu vergleichen, wurden beide Aliquots wie im Punkt 4.4.5 beschrieben, verarbeitet.

Dieser Versuch wurde wiederholt durchgeführt. Ein exemplarisches Ergebnis wird nachfolgend in tabellarischer Form präsentiert (Tabellen 4.12, Abbildungen 4.11).

In dem Versuch wurde deutlich, dass mit dem Affinitätsbindungsverfahren der CT in Verdünnungsstufe 1 und Verdünnungsstufe 2 früher erreicht wurde. Der PERT-Assay wurde also weniger stark durch Serumhemmstoffe inhibiert. Ab Verdünnungsstufe 3 näherte sich der CT der beiden Verfahren wieder einander an, der positive Effekt des Affinitätsbindungsverfahrens war also bis zur Verdünnung der Serumhemmstoffe 1:100 nachweisbar. Der positive Effekt des Affinitätsbindungsverfahrens konnte durch Wiederholungsuntersuchungen bestätigt werden.

4.4.5.2 MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1 : 9

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde im Verhältnis 1 : 9 in HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) eingespeist. Es wurden zwei Aliquots mit einer Viruslast von 5×10^6 Viren gebildet. Um die Auswirkungen des Affinitätsbindungsverfahrens mit dem Standardverdünnungsverfahren zu vergleichen, wurden beide Aliquots wie im Punkt 4.4.5 beschrieben, verarbeitet.

Dieser Versuch wurde wiederholt durchgeführt. Ein exemplarisches Ergebnis dieser Experimente wird nachfolgend in tabellarischer Form präsentiert (Tabellen 4.13, Abbildungen 4.12).

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Viruslast im RT-Schritt</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 9	Aufreinigung 899 100%	ca. 3.300.000 Viren	25,13
Probe 10	Aufreinigung 899 10%	ca. 330.000 Viren	27,92
Probe 11	Aufreinigung 899 1%	ca. 33.000 Viren	31,41
Probe 12	Aufreinigung 899 0,1%	ca. 3.300 Viren	34,89
Probe 13	Aufreinigung 899 0,01%	ca. 330 Viren	37,3
Probe 14	Aufreinigung 899 0,001%	ca. 33 Viren	
Probe 15	Aufreinigung 899 0,0001%	ca. 3,3 Viren	(unspezifisch) 36,73
Probe 16	Aufreinigung 899 0,00001%	ca. 0 Viren	
Probe 17	Aufreinigung 899 0,000001%	ca. 0 Viren	
Probe 18	Verdünnung 899 50%	ca. 100.000 Viren	31,99
Probe 19	Verdünnung 899 5%	ca. 10.000 Viren	30,16
Probe 20	Verdünnung 899 0,5%	ca. 1.000 Viren	31,71
Probe 21	Verdünnung 899 0,05%	ca. 100 Viren	35,6
Probe 22	Verdünnung 899 0,005%	ca. 10 Viren	
Probe 23	Verdünnung 899 0,0005%	ca 1 Vire	
Probe 24	Verdünnung 899 0,00005%	ca. 0 Viren	(unspezifisch) 36,2
Probe 25	Verdünnung 899 0,000005%	ca. 0 Viren	
Probe 26	Verdünnung 899 0,0000005%	ca. 0 Viren	

Tabelle 4.12: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 1 : 9

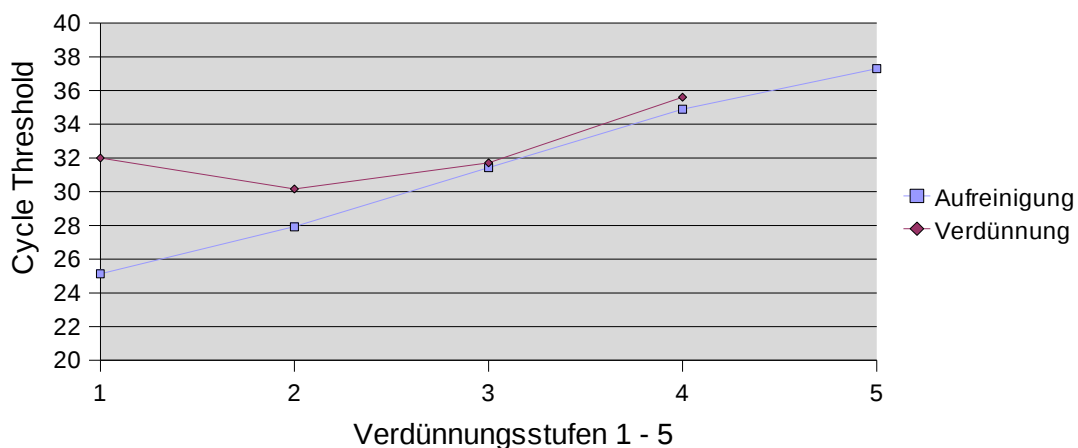


Abbildung 4.11: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 1 : 9

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Viruslast im RT-Schritt</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	Aufreinigung 899 in HIV+ Pl. 100%	ca. 3.300.000 Viren	30,45
Probe 2	Aufreinigung 899 10%	ca. 330.000 Viren	31,14
Probe 3	Aufreinigung 899 1%	ca. 33.000 Viren	33,08
Probe 4	Aufreinigung 899 0,1%	ca. 3.300 Viren	34,78
Probe 5	Aufreinigung 899 0,01%	ca. 330 Viren	35,58
Probe 6	Aufreinigung 899 0,001%	ca. 33 Viren	37,69
Probe 7	Aufreinigung 899 0,0001%	ca. 3 Viren	
Probe 8	Aufreinigung 899 0,00001%	ca. 0 Viren	
Probe 9	Aufreinigung 899 0,000001%	ca. 0 Viren	
Probe 10	Verdünnung 899 in HIV+ Pl. 50%	ca. 100.000 Viren	
Probe 11	Verdünnung 899 5%	ca. 10.000 Viren	35,86
Probe 12	Verdünnung 899 0,5%	ca. 1.000 Viren	35,87
Probe 13	Verdünnung 899 0,05%	ca. 100 Viren	35,95
Probe 14	Verdünnung 899 0,005%	ca, 10 Viren	37,7
Probe 15	Verdünnung 899 0,0005%	ca. 1 Vire	
Probe 16	Verdünnung 899 0,00005%	ca. 0 Viren	
Probe 17	Verdünnung 899 0,000005%	ca. 0 Viren	
Probe 18	Verdünnung 899 0,0000005%	ca. 0 Viren	
Probe 19	Plasma Patient 1 1000 μ l		
Probe 20	Serum Patient 1 1000 μ l		
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 1		
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 2		
Negativ Kontrolle	Lysispuffer		
Positiv Kontrolle	899 Überstand	1.330.000 Viren	24,29
Positiv nach RT	bekanntes RT Produkt		22,22

Tabelle 4.13: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Plasmahemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1 : 9

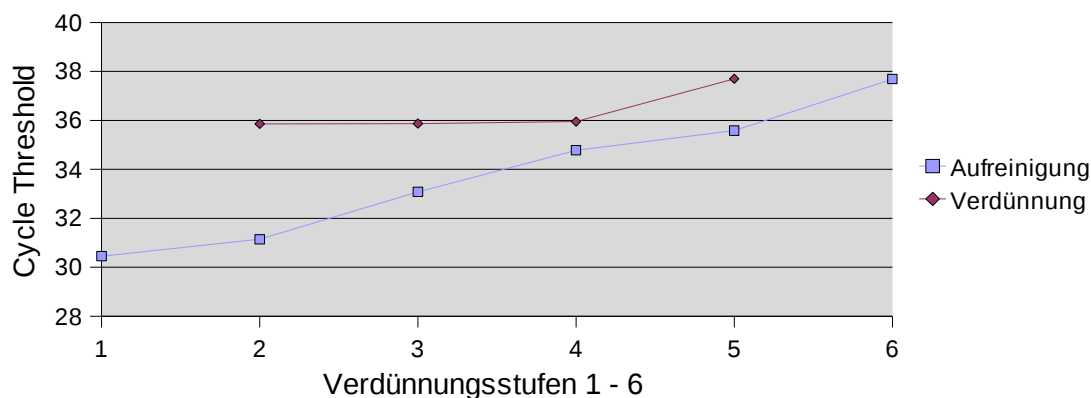


Abbildung 4.12: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1 : 9

Als Ergebnis dieser Experimente konnte festgehalten werden, dass durch das Affinitätsbindungsverfahren ein Nachweis von RT-Aktivität in HIV positiven Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) möglich ist. Im Verfahren „Herausverdünnen der Hemmstoffe“ gelang der Nachweis von RT-Aktivität nur teilweise. In einzelnen Proben war trotz ausreichender Viruslast keine RT-Aktivität nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Werden die beiden Verfahren miteinander verglichen, zeigte sich, dass in den einzelnen Verdünnungsstufen der CT durch das vorangestellte Affinitätsbindungsverfahren früher erreicht wurde. Der PERT-Assay wurde also weniger stark gehemmt.

4.4.5.3 MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum: Verhältnis 9 : 1

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde im Verhältnis 9:1 in HIV negatives Spenderserum eingespeist. Es wurden zwei Aliquots mit einer Viruslast von $4,5 \times 10^7$ Viren gebildet. Um die Auswirkungen des Affinitätsbindungsverfahrens mit dem Standardverdünnungsverfahren zu vergleichen, wurden beide Aliquots wie im Punkt 4.4.5 beschrieben, verarbeitet.

Dieses Experiment wurde wiederholt durchgeführt. Ein Resultat dieser Versuche wird exemplarisch in tabellarischer Form dargestellt (Tabellen 4.14, 4.13).

In den beiden verglichenen Verfahren wurde der CT im Rahmen der Messgenauigkeit in den einzelnen Verdünnungsstufen bei der gleichen Zyklenzahl erreicht. Das Affinitätsbindungsverfahren und das „Verdünnungsverfahren“ waren in diesem Versuchsaufbau nahezu gleichwertig. In dem hier exemplarisch dargestellten Versuch Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay 27 konnte in Verdünnungsstufe 1 allerdings nur mit dem Affinitätsbindungsverfahren eine RT-Aktivität nachgewiesen werden. Durch den hohen Proteinanteil der Probe im Verdünnungsverfahren bei Verdünnungsstufe 1 denaturierten die Eiweiße beim Erhitzen und verklumpten. Dies machte die Messung der RT-Aktivität mit diesem Versuchsaufbau unmöglich. Durch das Affinitätsbindungsverfahren wurden die Proteine weitgehend aus dem Reaktionsansatz entfernt. Auf diese Weise konnte mit dem Affinitätsbindungsverfahren auch in Verdünnungsstufe 1 die RT-Aktivität gemessen werden.

4.4.5.4 MvP-899 Zellkulturüberstand in „heat inactivated Serum“: Verhältnis 1 : 9

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde im Verhältnis 1:9 in „heat inactivated Serum“ (Inaktivierung durch Erhitzen im Wasserbad 56°C 30 min) eingespeist. In heat inactivated Serum ist das Komplementsystem inaktiv. Es wurden zwei Aliquots mit einer Viruslast von 5×10^6 Viren) gebildet. Um die Auswirkungen des Affinitätsbindungsverfahrens mit dem Standardverdünnungsverfahren zu vergleichen, wurden beide Aliquots wie im Punkt 4.4.5 beschrieben, verarbeitet.

Die Ergebnisse des Experiments werden in Tabelle 4.15 und Abbildung 4.14 dargestellt.

In dem Experiment wurde deutlich, dass mit dem Affinitätsbindungsverfahren der CT in Verdünnungsstufe 1 und Verdünnungsstufe 2 früher erreicht wurde. Der PERT-Assay wurde also weniger stark durch Serumhemmstoffe beeinflusst. Ab Verdünnungsstufe 3 näherte sich der CT der beiden Verfahren wieder einander an, der positive Effekt des Af-

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Viruslast im RT-Schritt</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	Aufreinigung 899: Serum 9:1 100%	ca. 30.000.000 Viren	17,54
Probe 2	Aufreinigung 899 10%	ca. 3.000.000 Viren	18,75
Probe 3	Aufreinigung 899 1%	ca. 300.000 Viren	21,55
Probe 4	Aufreinigung 899 0,1%	ca. 30.000 Viren	25,66
Probe 5	Aufreinigung 899 0,01%	ca. 3.000 Viren	29,18
Probe 6	Aufreinigung 899 0,001%	ca. 300 Viren	31,8
Probe 7	Aufreinigung 899 0,0001%	ca. 30 Viren	
Probe 8	Aufreinigung 899 0,00001%	ca. 3 Viren	
Probe 9	Verdünnung 899: Serum 9:1 50%	ca. 900.000 Viren	
Probe 10	Verdünnung 899 5%	ca. 90.000 Viren	19,46
Probe 11	Verdünnung 899 0,5%	ca. 9.000 Viren	20,64
Probe 12	Verdünnung 899 0,05%	ca. 900 Viren	23,89
Probe 13	Verdünnung 899 0,005%	ca. 90 Viren	27,5
Probe 14	Verdünnung 899 0,0005%	ca. 9 Viren	30,12
Probe 15	Verdünnung 899 0,00005%	ca. 0 Viren	
Probe 16	Verdünnung 899 0,000005%		
Probe 17	Aufreinigung 899 50 μ l Dynabeads	ca. 50.000.000 Viren	17,8
Probe 18	Aufreinigung 899 100 μ l Dynabeads	ca. 50.000.000 Viren	17,04
Positiv Kontrolle	899-Überstand	ca. 1.330.000 Viren	16,89
Negativ Kontrolle	Lysispuffer		
Negativ Kontrolle	Serum Negativ Proband		
Positiv nach RT	bekanntes RT- Produkt		17,98

Tabelle 4.14: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9 : 1

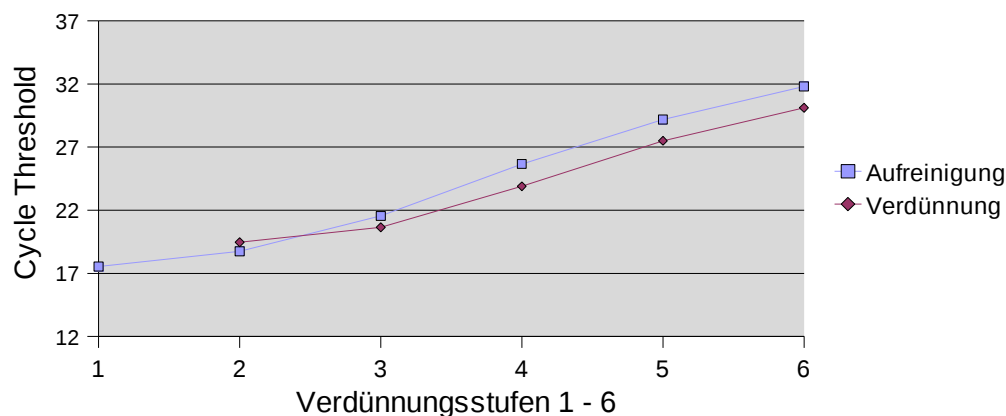


Abbildung 4.13: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9 : 1

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Viruslast im RT-Schritt</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	Aufreinigung 899 in inakt. Serum 100%	ca. 3.300.000 Viren	26,16
Probe 2	Aufreinigung 899 10%	ca. 330.000 Viren	27,85
Probe 3	Aufreinigung 899 1%	ca. 33.000 Viren	31,86
Probe 4	Aufreinigung 899 0,1%	ca. 3.300 Viren	35,05
Probe 5	Aufreinigung 899 0,01%	ca. 330 Viren	32,53
Probe 6	Aufreinigung 899 0,001%	ca. 33 Viren	(unspezifisch) 18,6
Probe 7	Aufreinigung 899 0,0001%	ca. 3,3 Viren	
Probe 8	Aufreinigung 899 0,00001%	ca. 0 Viren	
Probe 9	Verdünnung 899 in inakt. Serum 50%	ca. 100.000 Viren	30,57
Probe 10	Verdünnung 899 5%	ca. 10.000 Viren	30,28
Probe 11	Verdünnung 899 0,5%	ca. 1.000 Viren	32,34
Probe 12	Verdünnung 899 0,05%	ca. 100 Viren	34,96
Probe 13	Verdünnung 899 0,005%	ca. 10 Viren	37,03
Probe 14	Verdünnung 899 0,0005%	ca. 1 Vire	(unspezifisch) 8,246
Probe 15	Verdünnung 899 0,00005%	ca. 0 Viren	(unspezifisch) 11,65
Probe 16	Verdünnung 899 0,000005%	ca. 0 Viren	
Positiv Kontrolle	899-Überstand	ca. 1.330.000 Viren	17
Positiv nach RT	Bekanntes RT- Produkt		
Negativ Kontrolle	Lysispuffer		
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband		

Tabelle 4.15: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Affinitätsbindung versus Verdünnung von Serumhemmstoffen; MvP 899 Zellkulturüberstand in ‘heat inactivated‘ Serum Verhältnis 1 : 9

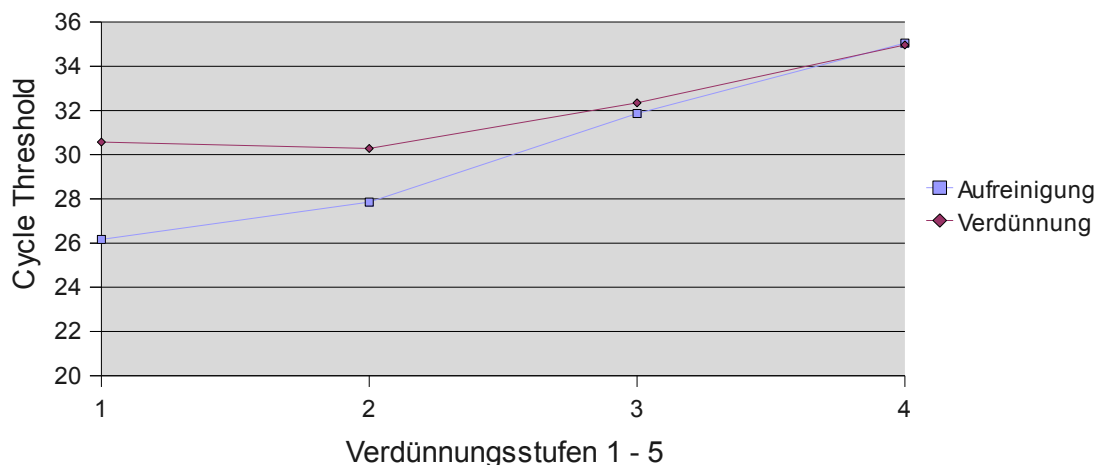


Abbildung 4.14: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in ‘heat inactivated‘ Serum Verhältnis 1 : 9

finitätsbindungsverfahrens war also bis zur Verdünnung der Serumhemmstoffe 1:100 nachweisbar.

4.4.6 Betrachtung der RT-Aktivität in verschiedenen Trägermedien

In dem folgenden Experiment sollten die Auswirkungen von spezifischen und unspezifischen Hemmstoffen, trotz der Durchführung des Aufreinigungsverfahrens auf den PERT-Assays näher untersucht werden. Blutserum bzw. Blutplasma enthält Inhibitoren des PERT-Assays. Diese Hemmstoffe sollen durch das Affinitätsbindungsverfahren Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay reduziert werden. Um die noch verbleibende Hemmung abzuschätzen wurde MvP 899 Zellkulturüberstand (Viruslast ca. 10^8 Viren/ml) in verschiedene Trägermedien eingespickt. In diesen Trägermedien wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen angelegt. Die einzelnen Proben (Volumen $450 \mu\text{l}$) wurden dann in den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay eingesetzt und anschließend mit dem PERT-Assay auf RT-Aktivität vermessen. Es wurde hierbei der CT bestimmt.

Als Trägermedien wurden verwendet:

1. R-10 Puffer: enthält keine Hemmstoffe des PERT-Assays und besitzt optimierte Salzkonzentrationen für den PERT-Assay
2. HIV negatives Serum: enthält unspezifische Serumhemmstoffe des PERT-Assays
3. HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze): enthält unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe des PERT-Assays

Bei unvollständiger Entfernung der Hemmstoffe aus dem Reaktionsansatz durch den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay wirken sich diese weiter hemmend auf den PERT-Assay aus. R10-Puffer hemmt die RT-Aktivität bzw. den PERT-Assay nicht, HIV negatives Serum müsste hemmend und HIV positives Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) am stärksten hemmend wirken.

Idealerweise werden durch das Affinitätsbindungsverfahren in jeder Probe die Inhibitoren in dem gleichen Maße aus dem Reaktionsansatz entfernt. Innerhalb eines Trägermediums sollten die einzelnen Verdünnungsstufen den CT also im Abstand von 3,3 Cyclen erreichen. Wird eine Virusmenge z. B.: 450.00 Viren, in unterschiedlichen Trägermedien betrachtet, sollte zunächst die Probe in R10-Puffer, dann diejenige in HIV negativem Serum und schließlich diejenige in HIV positivem Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) den CT erreichen.

Die Ergebnisse des Experiments werden in Tabelle 4.16 und Abbildung 4.15 dargestellt.

Als Ergebnis des Versuchs konnte festgehalten werden, dass durch das entwickelte Affinitätsbindungsverfahren Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay unspezifische und spezifische Serum- bzw. Plasmahemmstoffe zwar reduziert wurden, jedoch noch weiter im Reaktionsansatz vorhanden waren und den PERT-Assay hemmten. Unter optimalen Reaktionsbedingungen (Verdünnungsreihe in R10 Puffer) wurde der CT der einzelnen Verdünnungsstufen früher erreicht, als in den Vergleichsgruppen. In der graphischen Darstellung

<i>Sample Name</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Viruslast im RT-Schritt</i>	<i>Cycle Threshold (CT)</i>
Probe 1	899 in HIV neg. Serum 1. Verd.	ca. 4.500.000 Viren	20,89
Probe 2	899 in HIV neg. Serum 2. Verd.	ca. 450.000 Viren	24,52
Probe 3	899 in HIV neg. Serum 3. Verd.	ca. 45.000 Viren	27,22
Probe 4	899 in HIV neg. Serum 4. Verd.	ca. 4.500 Viren	30,59
Probe 5	899 in HIV neg. Serum 5. Verd.	ca. 450 Viren	31,84
Probe 6	899 in HIV neg. Serum 6. Verd.	ca. 45 Viren	32,64
Probe 7	899 in HIV pos. Plasma 1. Verd.	ca. 4.500.000 Viren	25,44
Probe 8	899 in HIV pos. Plasma 2. Verd.	ca. 450.000 Viren	26,72
Probe 9	899 in HIV pos. Plasma 3. Verd.	ca. 45.000 Viren	29,54
Probe 10	899 in HIV pos. Plasma 4. Verd.	ca. 4.500 Viren	31,43
Probe 11	899 in HIV pos. Plasma 5. Verd.	ca. 450 Viren	32,07
Probe 12	899 in HIV pos. Plasma 6. Verd.	ca. 45 Viren	31,91
Probe 13	899 in R10 Puffer 1. Verd.	ca. 4.500.000 Viren	18,25
Probe 14	899 in R10 Puffer 2. Verd.	ca. 450.000 Viren	19,42
Probe 15	899 in R10 Puffer 3. Verd.	ca. 45.000 Viren	21,26
Probe 16	899 in R10 Puffer 4. Verd.	ca. 4.500 Viren	24,66
Probe 17	899 in R10 Puffer 5. Verd.	ca. 450 Viren	28,87
Probe 18	899 in R10 Puffer 6. Verd.	ca. 45 Viren	30,21
Probe 19	Aufreinigung 899 Überstand	ca. 50.000.000 Viren	16,74
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 1		
Negativ Kontrolle	Serum negativ Proband 2		
Positiv Kontrolle	899 Überstand	ca. 1330000 Viren	20,63
Negativ Kontrolle	Lysispuffer		
Positiv nach RT	bekanntes RT- Produkt		

Tabelle 4.16: Real Time PCR Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Bestimmung der RT-Aktivität anhand des CT in R10-Puffer, in HIV negativem Serum, in HIV positivem Plasma

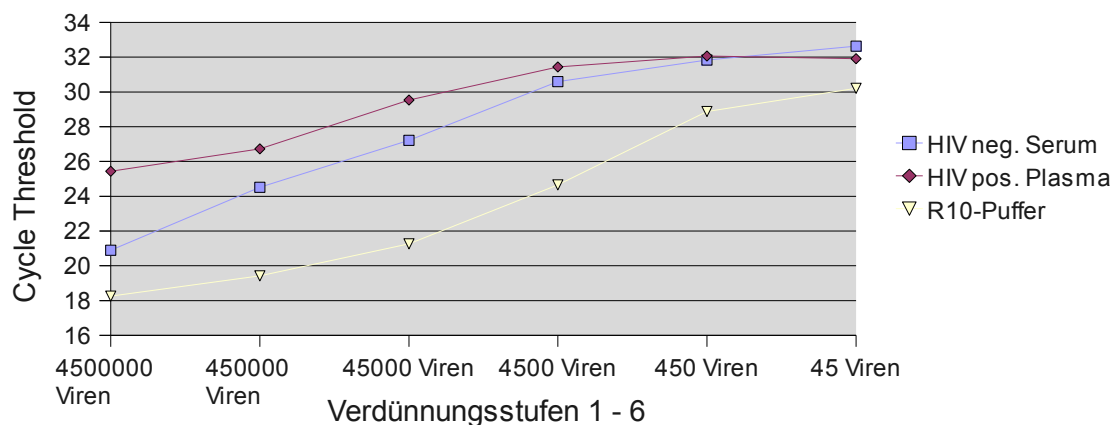


Abbildung 4.15: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich der RT-Aktivität anhand des CT in R10-Puffer, in HIV negativem Serum, in HIV positivem Plasma

(Abbildung 4.15) ist der Graph in HIV negativen Serum gegenüber R10-Puffer auf der y-Achse nach oben verschoben, das bedeutet, das Serumhemmstoffe weiter aktiv waren und den PERT-Assay hemmten. Der Graph in HIV positiven Plasma (Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze) ist gegenüber HIV negativen Serum nochmals weiter auf der y-Achse verschoben. Dies bedeutet, das auch spezifische Inhibitoren in den Proben weiter aktiv waren und den PERT-Assay zusätzlich hemmten. Die Hemmstoffe des PERT-Assays wurden durch das Affinitätsbindungsverfahren zwar reduziert, aber nicht vollständig entfernt und beeinflussten den PERT-Assay weiter negativ.

5 Diskussion

5.1 Einschränkungen des PERT-Assays: Nachweis von RT-Aktivität im Blutplasma

Der Nachweis von RT-Aktivität mit dem PERT-Assay unterliegt Limitierungen. Martin Obermeier konnte in seiner Dissertation aus dem Jahre 2006 RT-Aktivität in Blutplasma HIV negativer Patienten, dem Virus aus Zellkultur hinzugefügt wurde, detektieren (Obermeier, 2006). Es wurde hierbei das von Garcia-Lerma (1998) für den Amp-RT Assay beschriebenen Verfahren verwendet. In diesem Protokoll wurden 2 μl Plasma direkt in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt. Es gelang so, umgerechnet 20 Viren im Reaktionsansatz zu detektieren, dies entspricht bei einem Plasmaeinsatz von 2 μl einer Viruslast von 10^4 Viren/ml. Aus Plasma HIV positiver, therapierter Patienten konnte mit diesem Verfahren, trotz Viruslasten bis 10^5 Viren/ml, keine RT-Aktivität gemessen werden.

Gründe für den schwierigen Nachweis von RT-Aktivität aus Plasma infizierter Patienten sind Hemmstoffe. Mögliche Inhibitoren des PERT-Assays bzw. der reversen Transkriptase sind antiretrovirale Medikation im Plasma therapierter Patienten, RNA bindende Proteine oder Antikörper gegen die reverse Transkriptase.

Im Rahmen dieser Disseration wurden Verfahren für HIV sondiert, die es ermöglichen, HIV aus Plasma infizierter Patienten aufzureinigen und die Aktivität der RT des Virus mit dem PERT-Assay zu messen. Es konnte hierbei nicht auf bestehende Verfahren zurückgegriffen werden. Es wurden verschiedene Verfahren zur Affinitätsbindung entworfen und getestet. In der Diskussion werden im ersten Teil die einzelne Verfahren kritisch diskutiert, im zweiten Teil werden vorbeschriebene Aufreinigungsverfahren vorgestellt und mit dem hier Entwickelten verglichen. Im dritten Teil soll auf Störfaktoren des Affinitätsverfahrens und mögliche Anwendungsgebiete eingegangen werden.

5.2 Entworfenene und Getestete Verfahren zur Affintätsbindung

5.2.1 Raji-Zellmembran Assay

Angelehnt an ein von Zhou und Montefiori (1996) beschriebenes Verfahren wurde der Versuch unternommen, HIV über Komplementrezeptoren an eine feste Phase zu binden. Zhou und Montefiori (1996) beschrieben eine Versuchsanordnung, bei der sie Immunkomplexe

bestehend aus HIV, Antikörper und Komplement, in einer 96 Well Platte an einen rekombinanten CR (CR1) banden. Die Bindung des Virus wurde durch Messung von p24 Antigen verifiziert.

Raji-Zellen (B-Zell-Lymphom Linie) exprimieren auf ihrer Oberfläche CR, unter anderem den CR2 CD21. Die Bindung von Immunkomplexen bestehend aus HIV, Antikörper und Komplement an CR2 wurde ebenfalls von Montefiori et al. (1992) beschrieben.

Im Raji-Zellmembran Assay untersuchten wir zunächst die Möglichkeit, HIV aus der Zellkultur (HIV-Dauerkultur MvP 899) in Gegenwart von Komplement an vorpräparierte Raji-Zellmembranen zu binden und anschließend eine RT-Aktivität mit dem PERT- Assay zu detektieren. In jedem dieser Versuche wies diejenige Negativ Kontrolle, die Raji-Zellmembranen enthielt, eine reverse Transkriptase Aktivität auf. Raji-Zellmembranen wurden daraufhin auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ein RNA-Template ohne Zugabe einer exogenen RT revers zu transkribieren. Raji-Zellmembranen zeigten deutlich eine eigenständige RT-Aktivität. Dem Ursprung dieser RT-Aktivität wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter nachgegangen. Diskutiert werden kann eine RT-Aktivität zellulärer membran-gebundener Polymerasen (Franklin et al., 2004) und Telomerasen, sowie eine eigenständige RT.

Zusammenfassend zeigte sich, das durch Nachweis einer RT-Aktivität mit dem Raji-Zellmembran Assay keine Aussage gemacht werden konnte, ob eine Bindung des Virus an CR2 stattgefunden hatte. Der PERT-Assay misst die Aktivität der reversen Transkription, er kann diese Aktivität aber nicht nach ihrem Ursprung differenzieren. Durch den Nachweis der endogenen RT-Aktivität von Raji-Zellmembranen erscheint dieses Verfahren zur Affinitätsbindung im Zusammenhang mit einer phänotypischen Resistenztestung ungeeignet.

5.2.2 Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay

5.2.2.1 HIV Zellkulturüberstand in verschiedenen Trägermedien

Protein-A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das Molekulargewicht beträgt 35-50 kDA. Protein-A bindet spezifisch den Fc-Teil von IgG verschiedener Säugetierspezies. Die Bindungskapazität von Protein-A Agarose für Antikörper der Klasse IgG beträgt 10–20mg/ml. Protein-A Agarose, ge-coated mit Anti-C3d Antikörpern der Klasse IgG, wurde als feste Phase für ein Affinitätsbindungsverfahren von HIV verwendet.

Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus erschienen inhomogen. MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in verschiedene Trägermedien eingespeist. Diese Trägermedien enthielten die, für das Affinitätsbindungsverfahren notwendigen Komplementfaktoren. Als Trägermedien dienten Human Complement Serum, HIV negatives Serum und Hitze inaktiviertes Serum eines HIV negativen Probanden. Eine RT-Aktivität konnte im Anschluss an den Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay durch den PERT-Assay detektiert werden.

Alle verwendeten Trägermedien waren HIV negativ, das heißt sie enthielten keine spezifischen Serumhemmstoffe. In diesem Versuchsaufbau schwankte die untere Nachweisgrenze für HIV zwischen 100 Viren/ml und 100.000 Viren/ml. Im Mittel lag sie bei ca. 10.000

Viren/ml. Aufgrund der geringen Fallzahl der Versuche wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Einschränkend muss weiter hinzugefügt werden, dass nach Inkubation des Virus mit dem Trägermedium eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl angelegt wurde. Die unspezifischen Serumhemmstoffe wurden also aus dem Reaktionsansatz herausverdünnt und beeinflussten den PERT-Assay mit zunehmender Verdünnung in immer geringeren Maße.

Insofern konnte mit dem Komplement-HIV-Agarose Bindungsassay hinsichtlich der Sensitivität in HIV negativen Serum keine Verbesserung gegenüber dem direkten Einsatz von Plasma in den PERT-Assay (Obermeier, 2006) erzielt werden.

5.2.2.2 Nachweis von RT-Aktivität in Patientenplasma

Es wurden zwei Plasmen von HIV positiven Patienten auf RT-Aktivität hin untersucht. Die Viruslast der Plasmen war bekannt. Plasma 1 wies eine Viruslast >100.000 Viren/ml, Plasma 2 eine Viruslast von >10.000 Viren/ml auf. Beide Plasmen wurden direkt und nach Zugabe von externen Komplement (Human Complement Serum) in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzt. Es wurden $200 \mu\text{l}$ Plasma, also ca. 20.000 Viren (Plasma 1) und 2.000 Viren (Plasma 2) verarbeitet. In beiden Plasmen ließ sich mit und ohne Zugabe von externen Komplement eine RT-Aktivität mit dem PERT-Assay nachweisen.

Es ist mit diesem Verfahren erstmals gelungen, RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial mit dem PERT-Assay nachzuweisen.

5.2.2.3 Einschränkungen des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays

Im Rahmen der Erprobung des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays zur Aufreinigung von HIV wurden einige Probleme des Versuchsaufbaus deutlich.

Protein-A Agarose zur Verwendung als feste Phase ist relativ kostengünstig und weist eine hohe Bindungskapazität für Antikörper der IgG Klasse (Bindungskapazität $10\text{--}20\text{mg}$ IgG/ml) auf. Zum vollständigen Coating der Protein-A Agarose waren hohe Antikörpermengen nötig. Die Bindung der Antikörper ist spezifisch für IgG. Dies bedeutet, dass bei unvollständigem Coating mit Anti-C3d Antikörpern körpereigene Antikörper gebunden werden können. In HIV positivem Plasma ist so unter Umständen auch die Bindung von Antikörpern möglich, die die RT-Aktivität negativ beeinflussen. Die Aufreinigung über C3d birgt zudem die Gefahr, dass von Komplement opsonierte Viren und Bakterien ebenfalls gebunden werden und unter Umständen zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Versuche zeigten sich weitere Schwierigkeiten. Die Virusverluste durch Waschung erschienen relativ hoch. Der Waschpuffer wurde nach jeder Waschung asserviert und mittels PERT-Assay auf RT-Aktivität hin untersucht. Es ließ sich nach jeder Waschung im Asservat RT-Aktivität nachweisen. Dieses Phänomen kann durch folgende Hypothesen erklärt werden:

- Die Antigen-Antikörper Bindung über Komplement an die feste Phase war unvollständig.

- Nur ein Teil der Viren war von Komplement umhüllt.
- Durch den Waschschrift mit Zentrifugation und Dekantierung wurden die Viren aus ihrer Bindung herausgelöst.
- Das Verhältnis gebundenes Virus zu gelöstem Virus stand in einem stabilen Gleichgewicht, sodass sich nach Dekantieren und anschließender Zugabe des Waschpuffers sich das Konzentrationsverhältnis wieder neu einstellte.

Eine weitere Schwierigkeit dieses Versuchsaufbaus lag in der aufwändigen Verarbeitung der Proben. So mussten die Proben in allen Verfahrensschritten händisch bearbeitet werden. Die Trennung von Überstand und Protein-A Agarose in den Waschschriften erfolgte per Hand. Bei ungenauem Arbeiten verblieb eine Flüssigkeitssäule über der Protein-A Agarose zurück; oder aber bei dem Versuch der sehr genauen Trennung wurde Protein-A Agarose mit in die Pipette aufgenommen.

5.2.3 Anti-HLA-DR Bindungsassay

Der Anti-HLA-DR Bindungsassay war eine Weiterentwicklung des Komplement-HIV-Agarose Bindungsassays. Die Verwendung von Dynabeads Pan Mouse IgG (binden spezifisch Mäuse IgG) hatte gegenüber der Protein-A Agarose Vorteile. Da die Dynabeads Pan Mouse IgG spezifisch für in Mäusen produzierte IgG Antikörper sind, wurde die Bindung körpereigener Antikörper an die feste Phase unterbunden. In Menschen gebildete Antikörper, die ggf. mit dem PERT-Assay interferieren, sollten so durch Waschung vollständig aus dem Reaktionsansatz entfernt werden können. Weiter war durch Verwendung der Dynabeads eine schärfere Trennung zwischen fester Phase und Flüssigkeitssäule beim Dekantieren in den Waschschriften möglich.

Als Angriffspunkt für das Aufreinigungsverfahren dienten HLA-DR Proteine auf der Oberfläche von HIV. Dadurch sollte in zellfreien Proben die unspezifische Bindung von durch Komplement opsonierte Viren und Bakterien minimiert werden.

Eine Bindung des Virus über HLA-DR erschien weiterhin günstiger, da HLA-DR Proteine direkt in der Virushülle inkoperiert sind (Saarloos et al., 1997) und somit das Virus über Antikörper gegen HLA-DR direkt an die feste Phase gebunden wird. Bei Bindung über Komplement ist die Bindung zusätzlich abhängig von der Aktivität des Komplementsystems und von der Intensität der Bindung zwischen HIV und Komplement.

5.2.3.1 Aufreinigung von MvP 899 Zellkulturüberstand in Abwesenheit von Plasmahemmstoffen

Der Nachweis von RT-Aktivität aus MVP 899 Zellkulturüberstand in 0,9% NaCl konnte mit dem Anti-HLA-DR Bindungsassay geführt werden. Es scheint also grundsätzlich möglich, HIV über Antikörper gegen HLA-DR Proteine an eine feste Phase zu binden.

Die untere Nachweisgrenze für RT-Aktivität lag in dem exemplarisch vorgestellten Experiment bei 3.750 Viren. Werden alle durchgeführten Versuche betrachtet, zeigte sich, dass

der Anti-HLA-DR Bindungsassay wenig stabil ist, und starken Schwankungen in Bezug auf Sensitivität unterworfen ist. In zwei Versuchen konnte innerhalb einer Verdünnungsreihe eine RT-Aktivität bei hoher Viruslast nicht, hingegen bei niedrigeren Viruslasten noch nachgewiesen werden. Diese Störanfälligkeit kann auf der einen Seite durch die geringe Automatisierung erklärt werden, auf der anderen Seite besteht noch weiterer Optimierungsbedarf in den Reaktionsbedingungen des Affinitätsbindungsverfahrens, z. B.: Optimierung des Puffers bei Bindung der Antikörper an die feste Phase, Optimierung des Waschpuffers.

Diesen Fragestellungen wurde in der Weiterentwicklung des Verfahrens Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay) nachgegangen.

5.2.4 Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay

Im Zuge der kontinuierlichen Weiterentwicklung des Affinitätsbindungsverfahrens wurde die Zielstruktur auf HIV für eine Antigen-Antikörperbindung auf die gesamte Klasse der HLA 2 Proteine ausgeweitet. Grundlage hierfür ist die Inkorporation von HLA 2 Proteinen der Wirtszelle in die Hüllmembran von HIV beim budding aus der Wirtszelle (Trubey et al., 2003). Neben HLA-DR werden auch in geringerem Umfang HLA-DP und HLA-DQ in die Hüllmembran von HIV aufgenommen.

Zur Optimierung der Bindungsbedingungen der Antikörper wurde in Rücksprache mit der Fa. Dynal (Hersteller der Dynabeads Pan Mouse IgG) eine Umstellung auf PBS+0,1% BSA pH7,4 Puffer als Bindungspuffer (Coating der Dynabeads Pan Mouse IgG mit Antikörper gegen HLA-DR+DP+DQ) und Waschpuffer vorgenommen.

5.2.4.1 RT-Aktivität in HIV negativem Serum

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in HIV negatives Serum eingespeist. Es wurde eine Verdünnungsreihe in HIV negativem Serum angelegt. Die RT-Aktivität wurde im Anschluss an das Aufreinigungsverfahren mit dem PERT-Assay gemessen. Die untere Nachweisgrenze schwankte zwischen 4.500 Viren (10.000 Viren/ml) und 45 Viren (100 Viren/ml). Im Mittel lag die untere Nachweisgrenze rechnerisch bei 2.648 Viren.

Martin Obermeier setzte, im Rahmen seiner Dissertation (Obermeier, 2006), Viren in HIV negativen Plasma direkt in den PERT-Assay ein. Analog zu dem von García-Lerma et al. (1998) für den Amp-RT Assay beschriebenen Verfahren wurden 2 μ l Plasma direkt in den RT-Schritt des PERT-Assays eingesetzt. Die untere Nachweisgrenze lag absolut bei 20 Viruspartikeln pro Probe; dies entsprach bei einem Einsatz von 2 μ l einer Viruslast von 10.000 Viren/ml.

In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau wurde der Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay dem PERT-Assay vorangestellt. Durch Vorschalten des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays lag die untere Nachweisgrenze von RT-Aktivität, trotz Virusverlusten durch Waschschritte, zumindest im Bereich der direkten Messung durch den PERT-Assay. In einzelnen Versuchen konnte die untere Nachweisgrenze bis auf 100 Viren/ml gedrückt werden. Diese sehr tief liegende Grenze konnte aber nicht in jedem Versuch repliziert werden.

5.2.4.2 Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial

Derzeit werden überwiegend drei Verfahren zum Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial verwendet.

García-Lerma et al. (1998) stellten ein Verfahren vor, bei dem 2 μl Plasma direkt in den RT-Schritt des Amp-RT Assays eingesetzt wurden. Es wurden 50 Plasmen von Patienten mit bekannter HIV Infektion vermessen, in 38 Plasmen (76%) war eine RT-Aktivität nachweisbar. Als untere Nachweisgrenze für dieses Protokoll wurden 1.000 Viren/ml angegeben. Dies entspricht bei einem Einsatz von 2 μl in den Reaktionsansatz einer Menge von 2 Viren. Einzelne Proben mit zum Teil höherer Viruslast (z. B.: 6900 Viren/ml) zeigten jedoch keine RT-Aktivität. Diese Daten konnten für den PERT-Assay durch unsere Arbeitsgruppe nicht repliziert werden. Bei direktem Einsatz von 2 μl Plasma in den RT-Schritt des PERT-Assays gelang es trotz Viruslasten bis 100.000 Viren/ml nicht, RT-Aktivität nachzuweisen (Obermeier, 2006). Als Ursache hierfür wurde unter anderem die 10fach längere Schreiblänge im RT-Schritt des PERT-Assays im Vergleich zum Amp-RT Assay und damit die höhere Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren diskutiert (Obermeier, 2006).

Böni et al. (1996) und García-Lerma et al. (1999) führten ihre Messungen zur RT-Aktivität aus Patientenplasma nach Ultrazentrifugation des Plasmas durch. Es wurden untere Nachweisgrenzen von ca. 500 Viren/ml ermittelt. Diese Verfahren erscheinen allerdings aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes sowie aufgrund der teuren Gefäße für die Ultrazentrifugation für den Routinebetrieb ungeeignet. Zudem müsste ein Bio-Sicherheitslabor der Klasse 3** mit Ultrazentrifugationseinheit gestellt werden. Eine weitere Schwierigkeit liegt in dem Risiko des Probenverlustes. Nach Ultrazentrifugation muss ein, für das menschliche Auge nicht sichtbares Virenpellet in Lysispuffer aufgenommen werden.

Ein bereits kommerziell erhältliches Verfahren zum Nachweis von RT-Aktivität aus Patientenmaterial bietet die Firma CAVIDI (ExaVir, Cavid Tech-AB, Uppsala; Schweden) an. In diesem Verfahren wird Plasma HIV infizierter Personen zunächst mit einem Sulfhydryl reaktiven Agens inkubiert, um endogene Polymerasen zu inaktivieren. Anschließend werden die Proben an einem anionischen Ionenaustauschmedium immobilisiert und Hemmstoffe der RT durch Waschung entfernt. Der Nachweis einer RT-Aktivität in diesem Verfahren erfolgt mit einem konventionellen RT-Assay. In einer von Braun et al. (2003) durchgeführten Studie wurden mit diesem Verfahren 322 Plasmaproben HIV positiver Patienten auf RT-Aktivität untersucht. In 70% der Plasmaproben konnte RT-Aktivität nachgewiesen werden. In Proben mit einer Viruslast unter 50 Viren/ml konnte zu 14% , in Proben mit einer Viruslast zwischen 50–10.000 Viren/ml zu 48%, in Proben mit einer Viruslast zwischen 12.500–63.000 Viren/ml zu 96% und in Proben mit einer Viruslast zwischen 79.000–5.000.000 Viren/ml zu 100% RT-Aktivität nachgewiesen werden.

Mit dem, im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Aufreinigungsverfahren Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay, untersuchten wir Serum/Plasma HIV positiver Patienten mit einer erwarteten Viruslast >1.000 Viren/ml auf RT-Aktivität.

Es wurden 23 Patientenplasmen mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay auf RT-Aktivität hin vermessen. In 11 Fällen (47,8%) konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. 2 Plasmen (8,7%) waren fraglich positiv, das heißt in der RealTime PCR erreich-

ten sie den CT nicht, in der Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte war aber eine spezifische Bande nachweisbar. In 10 Patientenplasmen (43,5%) war kein spezifisches Signal detektierbar.

Insgesamt wurden 7 Seren HIV positiver Patienten mit einer erwarteten Viruslast von > 1.000 Viren/ml vermessen. In 3 Fällen (42,9%) konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. Ein Serum (14,3%) war fraglich positiv, das heißt in der RealTime PCR erreichte es den CT nicht, in der Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte ließ sich jedoch eine spezifische Bande nachweisen. In 3 Patientenseren (42,9%) war keine RT-Aktivität detektierbar.

Ein genauer Vergleich zwischen den Daten von Braun et al. (2003) und unseren Ergebnissen ist nicht möglich, da die genaue Viruslast der meisten, von uns untersuchten Proben nicht bekannt war. Das Material wurde überwiegend von der HIV Ambulanz der LMU zur Verfügung gestellt. Die dortigen Ärzte stellten Blutproben zur Verfügung, bei denen sie aufgrund von Voruntersuchungen vermuteten, dass die Viruslast über 1000 Viren/ml läge. Eine genaue Bestimmung wurde nicht vorgenommen.

Durch Voranstellung des Affinitätsbindungsverfahrens Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay konnte in unserer Arbeitsgruppe erstmals RT-Aktivität direkt aus Patientensmaterial mit dem PERT-Assay detektiert werden.

Die Bearbeitungszeit der eingegangenen Proben mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay und PERT-Assay betrug ca. 2 Arbeitstage.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die grundsätzliche Entwicklung eines Affinitätsbindungsverfahrens durchgeführt. Um weitergehende Aussagen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität des Verfahrens tätigen zu können, sollte sicherlich eine Vermessung von Patientenplasmen mit genügend hoher Fallzahl und bekannten Viruslasten vorgenommen werden.

5.2.4.3 Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnung von Inhibitoren des PERT-Assays

Mit diesem Versuchsaufbau wurde das Affinitätsbindungsverfahren mit dem Herausverdünnen der Serum-/Plasmahemmstoffen verglichen. Ein Vorteil des Affinitätsbindungsverfahrens ist, dass das gesamte Aliquotvolumen (hier: $500 \mu\text{l}$) zur RT-Aktivitätsmessung herangezogen werden konnte. Viren aus $500 \mu\text{l}$ Aliquot wurden in $30 \mu\text{l}$ Lysispuffer inaktiviert. Theoretisch müsste also eine Anreicherung der Viren stattgefunden haben. Dem gegenüber stehen allerdings Virusverluste durch die einzelnen Waschschrte. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass durch die vollständige Aufnahme der Viren in Lysispuffer die Salzkonzentrationen im Reaktionsansatz für den PERT-Assays optimiert werden konnten.

Theoretisch müsste das Verdünnungsverfahren gegenüber dem Affinitätsbindungsverfahren eine Reihe von Nachteilen aufweisen. Durch das Verdünnungsverfahren konnte nur ein Teil der Viren aus dem zu vermessenden Aliquot in den PERT-Assay eingebracht werden. Je größer der Anteil von Plasma/Serum im Reaktionsansatz des PERT-Assay, desto mehr Proteine denaturieren im RT-Schritt. Dies kann zu einem vollständigen Gelieren des Reak-

tionsansatzes führen und damit eine Amplifikation in der PCR unmöglich machen. Durch direktes Einbringen des Plasmas/Serums in den RT-Schritt des PERT-Assays konnten die Salzkonzentrationen für den PERT-Assays nicht optimal eingestellt werden.

Die weitere Diskussion über die positiven und negativen Auswirkungen des Aufreinigungsverfahrens gegenüber des Verdünnungsverfahrens wird anhand der einzelnen Versuche geführt.

HIV Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 1 : 9

HIV negatives Serum enthält unspezifische Hemmstoffe des PERT-Assays. Solche unspezifischen Inhibitoren und Störfaktoren sind unter anderem:

- RNA-bindende Proteine.
- Hohe Eiweißkonzentrationen, die im RT-Schritt denaturieren und zu einem Gelieren des Reaktionsansatzes führen können.
- Nicht für den PERT-Assay optimierte Salzkonzentrationen.
- Zelluläre Polymerasen und Telomerasen mit intrinsischer RT-Aktivität, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in HIV negatives Serum eingespickt. Ein Aliquot wurde dem Aufreinigungsverfahren unterzogen, aus dem anderen Aliquot wurde die RT-Aktivität direkt bestimmt.

Die Diskussion und Interpretation wird anhand der im Kapitel 4.4.5.1 dargestellten Messergebnisse exemplarisch geführt.

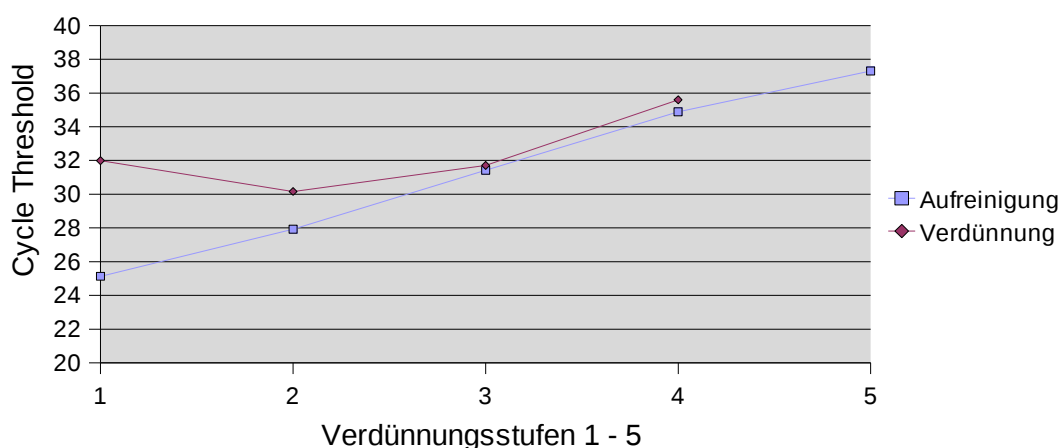


Abbildung 5.1: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 1 : 9

In der Abbildung 5.1 wird der CT in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt.

Der blaue (helle) Graph stellt das Verhalten der RT-Aktivität desjenigen Aliquots dar, dass mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay aufgereinigt wurde. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und die RT-Aktivität mit dem PERT-Assay bestimmt.

Der rote (dunkle) Graph stellt das Verhalten der RT-Aktivität desjenigen Aliquots dar, aus dem die Serumhemmstoffe in R10-Puffer herausverdünnt wurden.

Der Abstand ohne Inhibition durch Serumhemmstoffe müsste, zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen innerhalb einer Verdünnungsreihe, theoretisch 3,3 PCR-Zyklen betragen (Verdoppelung der DNA Menge nach jedem Zyklus, das heißt Verzehnfachung nach 3,3 Zyklen).

Bei Betrachtung der Messergebnisse des Affinitätsbindungsverfahrens erreichte Verdünnungsstufe 1 den Cut Off nach 25,13, Verdünnungsstufe 2 nach 27,92, Verdünnungsstufe 3 nach 31,41, Verdünnungsstufe 4 nach 34,89 und Verdünnungsstufe 5 nach 37,3 Zyklen.

Der Abstand zwischen Verdünnungsstufe 1 und Verdünnungsstufe 2 betrug 2,79 Zyklen. Eine Erklärung für den geringen Abstand ist, dass in Verdünnungsstufe 1 Serumhemmstoffe noch in höherer Konzentration vorhanden waren. Durch das Anlegen der Verdünnungsreihe in R10-Puffer werden Serumhemmstoffe zunehmend aus dem Reaktionsansatz herausverdünnt. Enthält Verdünnungsstufe 1 noch 100% Hemmstoffe, so sind in Verdünnungsstufe 2 noch 10% Hemmstoffe vorhanden. Der PERT-Assay wurde also in Verdünnungsstufe 2 weniger gehemmt, der Abstand zwischen den Proben war demzufolge geringer als 3,3 Zyklen.

Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wiesen in etwa einen Abstand von ca. 3,3 Zyklen auf. Dies spricht dafür, dass unspezifische Serumhemmstoffe kaum mehr ins Gewicht fallen.

Bei Betrachtung der Messergebnisse für das „Verdünnungsverfahren“ erreichte Verdünnungsstufe 1 den Cut Off nach 31,99, Verdünnungsstufe 2 nach 30,16, Verdünnungsstufe 3 nach 31,71 und Verdünnungsstufe 4 nach 35,6 Zyklen. Die einzelnen Verdünnungsstufen sollten den CT bei abnehmender Viruslast im Abstand von 3,3 Zyklen erreichen; wobei Verdünnungsstufe 1 mit der höchsten Viruslast den CT als Erstes erreichen sollte. Dies war nicht der Fall, der Einfluss von Störfaktoren des PERT-Assays schien zu intensiv zu sein. Trotz zunehmender Verdünnung der Serumhemmstoffe wurde der PERT-Assay in den ersten 3 Verdünnungsstufen noch derart inhibiert das sich der CT kaum unterschied. Erst zwischen Verdünnungsstufe 3 und Verdünnungsstufe 4 betrug der Abstand 3,9 Zyklen. Anders ausgedrückt bedeutete dies, dass nach 3 Verdünnungsschritten, also einer Verdünnung der unspezifischen Serumhemmstoffe um den Faktor 1.000, der PERT-Assay kaum mehr messbar negativ beeinflusst wurde. Der Graph nahm ab hier den theoretisch zu erwartenden Verlauf an.

Werden die beiden Graphen nun untereinander verglichen, wird der positive Einfluss des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays deutlich. Der blaue (helle) Graph (Aufreinigung) erreicht den CT in Verdünnungsstufe 1 nach 25,13 Zyklen, der rote (dunkle) Graph nach 31,99 Zyklen. Der Abstand zwischen beiden Proben betrug 6,86 Zyklen. Durch das Aufreinigungsverfahren wurden die unspezifischen Serumhemmstoffe soweit abgereichert, dass der CT 6,86 Zyklen früher erreicht wurde. Dies entspricht umgerechnet etwa dem Faktor 100 an Viruslast.

Mit zunehmender Verdünnung näherten sich die beide Graphen an. In der 2. Verdünnungsstufe betrug der Abstand 2,24 Zyklen. Zwischen Verdünnungsstufe 1 und Verdünnungsstufe 2 wurden unspezifische Serumhemmstoffen um den Faktor 10 herausverdünnt und beeinflussten den PERT-Assay in geringerem Maße.

Ab Verdünnungsstufe 3 verliefen die beiden Graphen nahezu gleich. Dies bedeutet, dass der positive Effekt des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays nach 100 facher Verdünnung ausgeglichen war. Durch die Möglichkeit mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay dem PERT-Assay größere Virusmengen zur Verfügung zu stellen, kann das Messergebnis nicht ausreichend erklärt werden. Selbst wenn es durch die Waschschriffe zu keinerlei Virusverlust kommen würde, könnte der Abstand von 6,86 Zyklen in Verdünnungsstufe 1 nicht alleine darauf zurückgeführt werden. Die unspezifischen Serumhemmstoffe des PERT-Assays müssen also durch das Aufreinigungsverfahren zum Teil aus dem Reaktionsansatz entfernt worden sein.

HIV Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 9 : 1

Im vorausgegangenen Versuch (Seite 78ff.) betrug der Serumanteil des zu untersuchenden Materials 90%. Es wurde in der Diskussion dargestellt, dass das Affinitätsbindungsverfahren eine Abreicherung der unspezifischen Serumhemmstoffe ermöglicht. Der positive Effekt des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays war bis zur 100fachen Verdünnung der unspezifischen Serumhemmstoffe sichtbar.

Der Serumanteil der Ausgangsaliquots in diesem Versuch betrug 10%. Legt man die Beobachtungen des Vorversuch (HIV Zellkulturüberstand in HIV negativen Serum Verhältnis 1 : 9; Anteil der unspezifischen Serumhemmstoffe im Ausgangsmaterial 10 fach höher) zugrunde, kann erwartet werden, dass der positive Effekt des Bindungsassays bis zu Verdünnungsstufe 2 reicht.

Tatsächlich schien bei Analyse der Messergebnisse das Voranstellen des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays bei einem Serumanteil von 10% im Ausgangsmaterial kaum Vorteile gegenüber dem Herausverdünnen von Serumhemmstoffe zu besitzen.

In Abbildung 5.2 wird der CT in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt.

In dem exemplarisch dargestellten Versuch unterschieden sich beide Graphen kaum. Lediglich direkt aus dem Ausgangsaliquot war im Verdünnungsverfahren keine RT-Aktivität messbar. Dies kann am ehesten durch Gelieren des Reaktionsansatzes im RT-Schritt des PERT-Assays bei hoher Eiweißkonzentration erklärt werden. Erst ab Verdünnungsstufe 2, also nach einer Reduktion der Serumhemmstoffe durch Verdünnung um den Faktor 10 war eine RT-Aktivität mit dem PERT-Assay nachweisbar. Ab Verdünnungsstufe 2 war kein Unterschied zwischen den Proben, die den Bindungsassay durchlaufen haben und den Proben aus denen die Serumhemmstoffe nur herausverdünnt wurden, hinsichtlich ihrer RT-Aktivität erkennbar. Bei erneuter Durchführung des Versuchs war eine RT-Aktivität mit beiden Methoden in allen Verdünnungsstufen nachweisbar. Bei einem Serumanteil von 10% im Probenmaterial wirkte sich der hemmende Effekt der unspezifischen Seruminhibitoren also nicht in dem Maße negativ auf den PERT-Assay aus, als dass die Abreicherung der Serumhemmstoffe durch das Affinitätsbindungsverfahren gegenüber dem Stan-

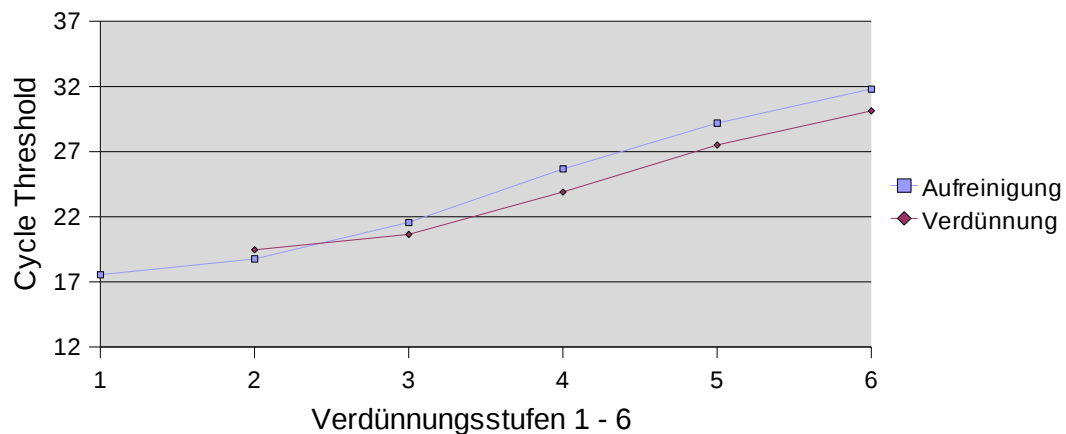


Abbildung 5.2: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum Verhältnis 9:1

Das verdünnungsverfahren signifikante Vorteile aufwies.

HIV Zellkulturüberstand in HIV positiven Plasma Verhältnis 1:9

Dieser Versuch stellte eine weitere Annäherung an die Situation im Patientenmaterial dar. HIV positives Plasma enthält neben unspezifischen Hemmstoffen, spezifische Hemmstoffe des PERT-Assays.

Solche spezifischen Inhibitoren und Störfaktoren sind unter anderem:

- Antikörper gegen die Untereinheiten der RT p51 und p66.
- Bei therapierten Patienten: Virostatika mit Zielstruktur RT.

MVP 899 Zellkulturüberstand wurde in HIV positives Plasma eingespeist. Ein Aliquot wurde in das Affinitätsbindungsverfahren eingesetzt, das Andere wurde mit dem Standardverdünnungsverfahren verarbeitet.

Die Diskussion und Interpretation der Messergebnisse wird exemplarisch an einem repräsentativen Versuch geführt.

In der Abbildung 5.3 wird der CT in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt.

Der blaue (helle) Graph stellt den CT desjenigen Aliquots in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dar, dass mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay aufgereinigt wurde.

Wird das Verhalten der Proben betrachtet, die das Affinitätsbindungsverfahren durchlaufen haben, so erreichte Verdünnungsstufe 1 den CT nach 30,45, Verdünnungsstufe 2 nach 31,14, Verdünnungsstufe 3 nach 33,08, Verdünnungsstufe 4 nach 34,78, Verdünnungsstufe 5 nach 35,58 Zyklen und Verdünnungsstufe 6 nach 37,69 Zyklen. Der Abstand zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen betrug weniger als 3,3 Zyklen.

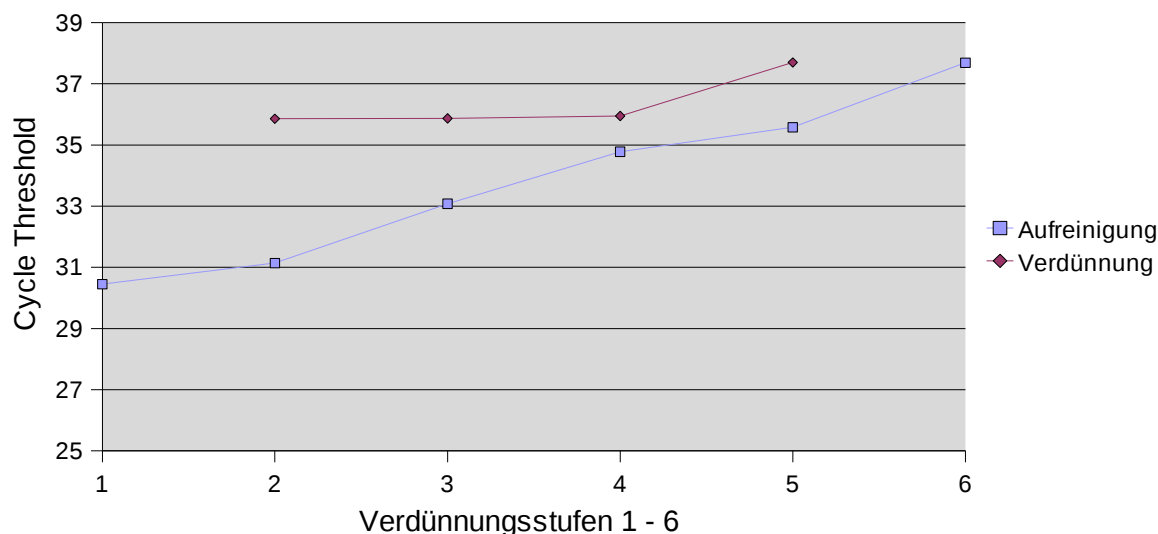


Abbildung 5.3: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in HIV positivem Plasma Verhältnis 1 : 9

Dieses Messergebnis kann folgendermaßen interpretiert werden. Von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe wurden Plasmahemmstoffe um den Faktor 10 herausverdünnt, sind also weniger aktiv. Mit zunehmender Verdünnung wurden die Proben weniger gehemmt, der CT wurde früher erreicht; der Abstand zwischen den Verdünnungsstufen war also geringer als 3,3 Zyklen.

Dieses Phänomen wurde bereits auf Seite 78ff. für HIV negatives Serum, das nur unspezifische Serumhemmstoffe enthielt, beschrieben. Die unspezifischen Serumhemmstoffe fielen nach 100 facher Verdünnung allerdings nicht mehr ins Gewicht. In HIV positiven Plasma lagen die Abstände in allen messbaren Verdünnungsstufen unter 3,3 Zyklen. Da unspezifische Serumhemmstoffe nur bis zu Verdünnungsstufe 3 den PERT-Assay spürbar beeinflussten, müssen für die durchgehende Hemmung des PERT-Assays spezifischen Plasmahemmstoffe verantwortlich gemacht werden. Die spezifischen Plasmahemmstoffe wurden durch den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay also nur zum Teil entfernt und waren in allen messbaren Verdünnungsstufen noch aktiv. Sie wurden auch durch Verdünnung nur unzureichend entfernt.

Der rote (dunkle) Graph stellt das Verhalten der RT-Aktivität desjenigen Aliquots dar, aus dem die Serumhemmstoffe in R10-Puffer herausverdünnt wurden. Verdünnungsstufe 1 erreichte den CT nicht, es war also keine RT-Aktivität nachweisbar, der PERT-Assay wurde zu stark gehemmt. Verdünnungsstufe 2 erreichte den CT nach 35,86, Verdünnungsstufe 3 nach 35,87, Verdünnungsstufe 4 nach 35,95 und Verdünnungsstufe 5 nach 37,70 Zyklen. Die Abstände zwischen den einzelnen Proben lagen deutlich unter 3,3 Zyklen; unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe waren aktiv. Die Verdünnung von HIV Zellkulturüberstand in HIV negativem Serum zeigte, dass unspezifische Serumhemmstoffe nach 100 facher Verdünnung den PERT-Assay nicht mehr wesentlich beeinflussen. Für die wei-

tere Hemmung der Proben in diesem Versuch müssen also spezifische Plasmahemmstoffe verantwortlich sein.

Werden die beiden Graphen nun untereinander verglichen, wird der positive Einfluss des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays noch deutlicher. Der blaue (helle) Graph (Aufreinigung) erreichte den CT in Verdünnungsstufe 1 nach 30,45 Zyklen, beim roten (dunklen) Graph (Verdünnung) konnte in Verdünnungsstufe 1 keine RT-Aktivität nachgewiesen werden. Bei Verdünnungsstufe 2 betrug der Abstand zwischen beiden Graphen 4,72 Zyklen. Bei Verdünnungsstufe 3 betrug der Abstand zwischen den beiden Graphen 2,79 Zyklen, bei Verdünnungsstufe 4 1,17 Zyklen und bei Verdünnungsstufe 5 2,12 Zyklen. Die beiden Graphen näherten sich also bei voranschreitender Verdünnung der Plasmahemmstoffe tendenziell aneinander an. Der positive Effekt des Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassays nahm also mit zunehmender Verdünnung des Aliquots ab, blieb aber in allen Verdünnungsstufen präsent.

Diese Ergebnisse wurden durch die Wiederholungsuntersuchung weitgehend bestätigt. Der positive Einfluss des Aufreinigungsverfahrens trat in der Wiederholungsuntersuchung noch deutlicher zu Tage. In den Proben in denen die Plasmahemmstoffe nur herausverdünnt wurden, war teilweise keine RT-Aktivität detektierbar, da der PERT-Assay vermutlich zu stark gehemmt wurde. In den Proben, die das Aufreinigungsverfahren durchlaufen haben, war dagegen durchgehend bis zu Verdünnungsstufe 4 eine RT-Aktivität nachweisbar.

HIV Zellkulturüberstand in „heat inactivated Serum“ Verhältnis 1 : 9

In diesem Experiment wurde untersucht, ob durch Hitzeinaktivierung von HIV negativem Serum die Auswirkung unspezifischer Serumhemmstoffe auf den PERT-Assay verändert wird. MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in Hitze inaktiviertes Serum (Verhältnis 1 : 9) eingespeist. Ein Aliquot wurde in das Aufreinigungsverfahren eingesetzt, das Anderen wurde mit dem Standardverdünnungsverfahren verarbeitet.

In der Abbildung 5.4 wird der CT in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt.

Die blaue (helle) Linie im Diagramm zeigt die Messergebnisse des Aliquots, dass zunächst mit dem Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay aufgereinigt und anschließend in R10-Puffer verdünnt wurde. Der Abstand zwischen Verdünnungsstufe 1 und Verdünnungsstufe 2 betrug 1,69 Zyklen. Als Erklärung dient folgende Hypothese: durch den Bindungsassay wurden die unspezifischen Serumhemmstoffe nicht vollständig aus dem Reaktionsansatz entfernt. Durch die Verdünnung der unspezifischen Serumhemmstoffe um den Faktor 10 wurde der PERT-Assay in Verdünnungsstufe 2 weniger stark inhibiert, was dazu führte, dass der CT früher erreicht wurde. Der Abstand zwischen den Proben war also geringer als 3,3 Zyklen. Der Abstand zwischen Verdünnungsstufe 2 und Verdünnungsstufe 3 betrug 4,01 Zyklen. Dies bedeutet, dass die unspezifischen Serumhemmstoffe so weit aus dem Reaktionsansatz herausverdünnt waren, dass der PERT-Assay nicht mehr spürbar negativ beeinflusst wurde.

Die rote (dunkle) Linie im Diagramm zeigt das Verhalten der Proben, aus deren Ausgangsaliquot die Hemmstoffe allein herausverdünnt wurden:

Verdünnungsstufe 1 erreichte den CT später als Verdünnungsstufe 2. Dies bedeutet,

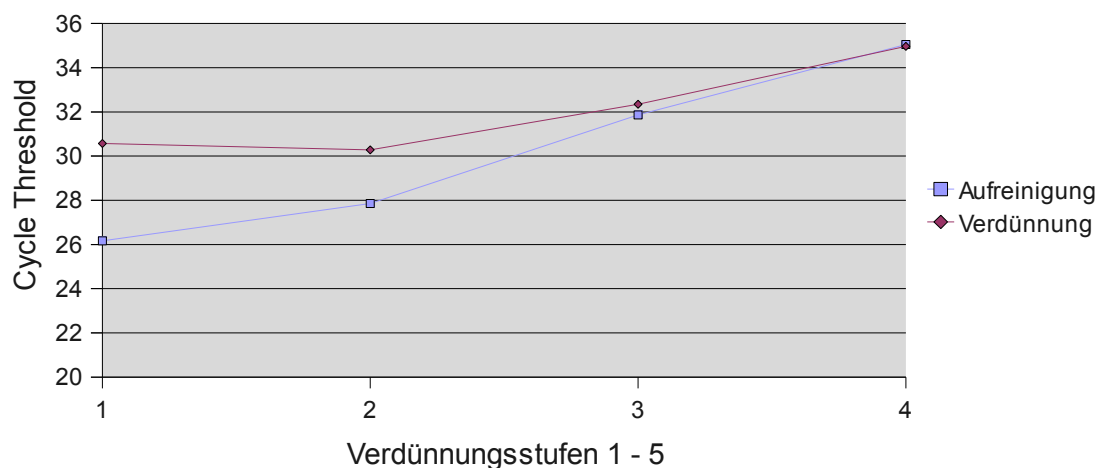


Abbildung 5.4: Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay: Vergleich des CT zur Bestimmung der RT-Aktivität im Affinitätsbindungsverfahren versus Verdünnungsverfahren; MvP 899 Zellkulturüberstand in „heat inactivated Serum“ Verhältnis 1 : 9

dass unspezifische Serumhemmstoffe noch stark aktiv waren. Der Abstand zwischen Verdünnungsstufe 2 und Verdünnungsstufe 3 betrug 2,06 Zyklen. Dies deutet darauf hin, dass unspezifische Serumhemmstoffe den PERT-Assay noch negativ beeinflusst haben. Der Abstand zwischen Verdünnungsstufe 3 und Verdünnungsstufe 4 betrug 2,62 Zyklen. Der PERT-Assay wurde also in allen Verdünnungsstufen negativ beeinflusst. Tendenziell sank aber der Einfluss der unspezifischen Serumhemmstoffe mit zunehmender Verdünnung.

Die Auswirkungen des Affinitätsbindungsverfahrens werden deutlich, wenn beide Graphen miteinander verglichen werden. Der Abstand beider Graphen bei Verdünnungsstufe 1 betrug 4,41 Zyklen, bei Verdünnungsstufe 2 2,43 Zyklen. Diese Abstände sind auf die Anreicherung der unspezifischen Serumhemmstoffe durch den Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay zurückzuführen. Ab Verdünnungsstufe 3 näherten sich die beiden Verdünnungsreihen aneinander an und verliefen im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu identisch. Daraus kann geschlossen werden, dass nach einer Verdünnung der unspezifischen Serumhemmstoffe um den Faktor 100, der PERT-Assay nicht mehr wesentlich beeinflusst wird.

Die Ausgangsfrage des Versuchs war, ob durch Hitze inaktiviertes Serum den PERT-Assay weniger stark hemmt als unbehandeltes Serum. Vergleicht man hierzu die Ergebnisse der entsprechenden Versuche, so sind diese im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Das heißt, dass die Inhibition des PERT-Assays unabhängig davon ist, ob das Serum bzw. Komplementsystem durch Hitze inaktiviert wurde oder nicht; oder anders ausgedrückt: Die unspezifischen Serumhemmstoffe werden durch Hitze nicht inaktiviert.

Aufreinigung von HIV Zellkulturüberstand in verschiedenen Trägermedien

MvP 899 Zellkulturüberstand wurde in R10-Puffer, HIV negatives Serum und HIV positives Plasma eingespeist. In den Trägermedien wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und nach Affinitätsbindung die RT-Aktivität gemessen. Hiefür wurde der CT bestimmt.

Wird der CT der einzelnen Verdünnungsstufen in Abhängigkeit von der Viruslast in ein Diagramm eingetragen, sollte sich im Idealfall für jedes Trägermedium eine Gerade ($y = mx + t$) konstruieren lassen. Je stärker sich Hemmstoffe des Trägermediums auf den PERT-Assays auswirken, desto weiter würde diese Gerade auf der Y-Achse nach oben verschoben werden.

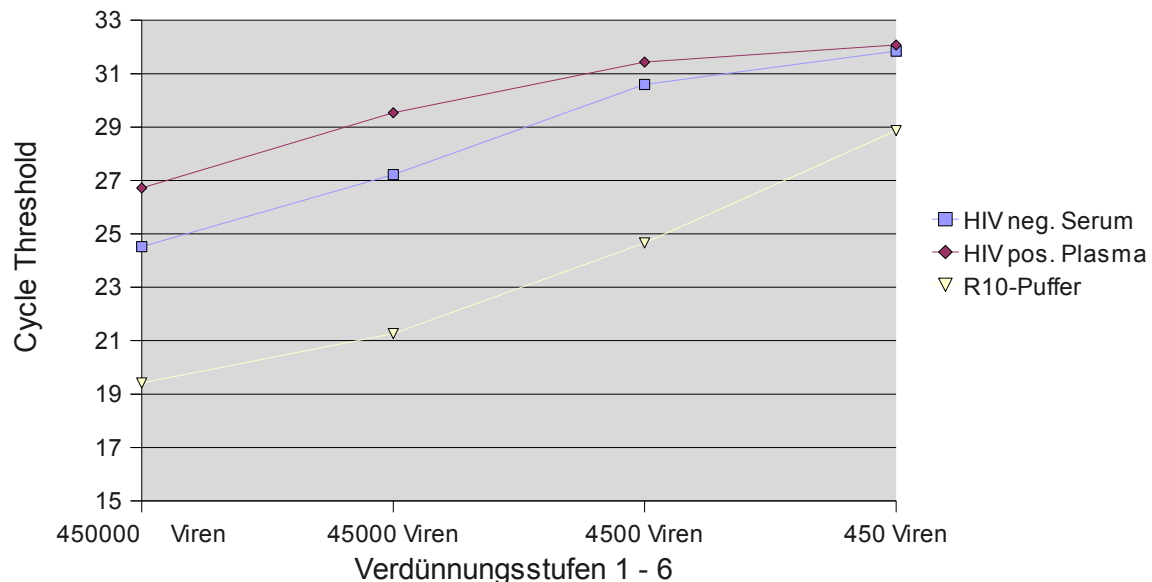


Abbildung 5.5: Graphische Darstellung des CT der einzelnen Verdünnungsstufen in R10-Puffer (gelber Graph), in HIV negativem Serum (blauer Graph) und HIV positivem Plasma (roter Graph).

In der Abbildung 5.5 wird der CT in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt.

Durch Vergleich der drei Verdünnungsreihen untereinander können die Einflüsse der Hemmfaktoren im Plasma/Serum näher charakterisiert werden.

Der Graph der Verdünnungsreihe von HIV Zellkulturüberstand in R10-Puffer verlief unterhalb der beiden anderen Graphen. Wird der Abstand zwischen der Verdünnungsreihe in R10-Puffer und der Verdünnungsreihe in HIV negativem Serum berechnet, betrug dieser im Mittel 4,17 Zyklen. Der Graph der Verdünnungsreihe in HIV negativem Serum ist auf der Ordinate also nach oben verschoben, der t-Wert ist also größer.

Aus der Verschiebung des Graphen in HIV negativem Serum auf der Ordinate um durchschnittlich 4,17 Zyklen kann geschlossen werden, dass die unspezifischen Serumhemmstoffe den PERT-Assay noch um mehr als das 10fache hemmen.

Der Abstand zwischen der Verdünnungsreihe in R10-Puffer und der Verdünnungsreihe in HIV positivem Plasma betrug im Mittel 5,74 Zyklen. Der Graph der Verdünnungsreihe in HIV positivem Plasma ist auf der Ordinate also noch weiter nach oben verschoben. Dies ist am ehesten auf den zusätzlichen Einfluss spezifischer Plasmahemmstoffe zurückzuführen. Aus der Verschiebung der Verdünnungsreihe in HIV positiven Plasma auf der Ordinate um durchschnittlich 5,74 Zyklen nach oben kann geschlossen werden, dass die unspezifischen

und spezifischen Plasmahemmstoffe den PERT-Assay noch um ca. den Faktor 100 hemmen.

Anhand der Berechnung des Mittelwertes des Abstandes zwischen der Verdünnungsreihe in HIV negativem Serum und der Verdünnungsreihe in HIV positivem Plasma kann auf die Hemmung durch spezifischen Plasma-/Serumhemmstoffe geschlossen werden. Die Verdünnungsreihe in HIV positivem Plasma war gegenüber der Verdünnungsreihe in HIV negativem Serum um durchschnittlich 1,57 Zyklen auf der Ordinate nach oben verschoben. Diese 1,57 Zyklen entsprechen der zusätzlichen Hemmung des PERT-Assays durch spezifische Plasmahemmstoffe.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu Aufreinigungsverfahren durchgeführt, mit dem Ziel, RT-Aktivität direkt aus Patientenmaterial nachzuweisen.

Mit dem PERT-Assay konnte RT-Aktivität von ca. 40 Viruspartikeln nachgewiesen werden (Obermeier, 2006). Der Versuch RT-Aktivität direkt aus dem Plasma HIV infizierter Patienten mit dem PERT-Assay zu bestimmen, gelang trotz Viruslasten bis 10^5 Viren/ml nicht (Obermeier, 2006). Ursächlich hierfür sind Inhibitoren des PERT-Assays bzw. der RT; unter anderem antiretrovirale Medikation im Plasma therapierter Patienten, RNA bindende Proteine oder Antikörper gegen die RT.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die grundsätzlichen Entwicklung eines Verfahrens zur Affinitätsbindung und Aufreinigung von HIV durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Strategien zur Affinitätsbindung von HIV entwickelt und getestet. Mit Hilfe dieser Affinitätsbindungsverfahren wurden Hemmstoffe des PERT-Assays durch Waschschriffe reduziert, um so die Messung der RT-Aktivität mit dem PERT-Assay zu ermöglichen. Als Zielstrukturen für diese Affinitätsbindungsverfahren wurden konservierte, subtypenuabhängige Bereiche in der Hüllmembran von HIV genutzt.

Es wurden Möglichkeiten untersucht, HIV mittels Komplement an Raji-Zellmembranen und an Antikörper gegen den Komplementfaktor C3d zu binden.

Raji-Zellmembranpräparationen zeigten, auch ohne Einsatz von HIV, eine RT-Aktivität im PERT-Assay. Es konnte gezeigt werden, dass Raji-Zellmembranen über eine intrinsische RT-Aktivität verfügen und so als feste Phase für ein Affinitätsbindungsverfahren ungeeignet sind.

Eine Affinitätsbindung von HIV-1 mittels Antikörper gegen den Komplementfaktor C3d, konnte nachgewiesen werden. Als feste Phase wurde Protein-A Agarose, ge-coated mit Antikörpern gegen C3d, verwendet. RT-Aktivität konnte in HIV negativem Serum, dem HIV-1 beigemischt wurde, nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag durchschnittlich bei ca. 15.000 eingesetzten Viren. In zwei Fällen konnte damit der Nachweis von RT-Aktivität direkt aus dem Plasma HIV positiver Patienten exemplarisch geführt werden. Die Sensitivität, die Teststabilität und die technische Durchführbarkeit des Verfahrens erschienen jedoch verbesserungsbedürftig, so dass nach weiteren Möglichkeiten zur Affinitätsbindung gesucht wurde.

Dazu wurde als weitere Möglichkeit erprobt, HIV mittels in die Hüllmembran von HIV inkorporierter HLA 2 Proteine, an eine feste Phase zu binden. Als feste Phase dieses Verfahrens wurden Dynabeads ge-coated mit 1) Antikörpern gegen HLA-DR und 2) Antikörper gegen HLA-DR+DP+DQ verwendet.

Mit diesen Verfahren konnte beigemischte HIV-1 RT-Aktivität in R10-Puffer, in HIV negativem Serum und in HIV positivem Plasma (Viruslast unterhalb Nachweisgrenze) nach-

gewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze für HIV in HIV negativem Serum schwankte zwischen 45 Viren (100 Viren/ml) und 4.500 Viren (10000 Viren/ml).

Mit dem Affinitätsbindungsverfahren wurde Plasma und Serum von HIV positiven Patienten mit einer zu erwarteten Viruslast > 1000 Viren/ml auf RT-Aktivität hin vermessen. Es wurden 30 Patientenmaterialien untersucht. In 14 Fällen (46,7%) konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. 3 Materialien (10%) waren fraglich positiv, das heißt in der Real Time PCR konnte kein spezifisches Signal detektiert werden, in der Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte war aber eine spezifische Bande nachweisbar. In 13 Patientenmaterialien (43,3%) war kein spezifisches Signal detektierbar.

Es wurde in weiteren Versuchsreihen untersucht, inwieweit sich unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe des PERT-Assays durch das Affinitätsbindungsverfahren reduzieren ließen. Hierfür wurde das Affinitätsbindungsverfahren mit dem Herausverdünnen der Hemmstoffe in Pufferlösung verglichen. Es ließ sich zeigen, dass die Hemmstoffe des PERT-Assays mit dem Affinitätsbindungsverfahren um ca. den Faktor 100 reduziert wurden.

Es wurde aber auch deutlich, dass unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe trotz des vorangestellten Affinitätsbindungsverfahrens den PERT-Assay weiter negativ beeinflussen. HIV negatives Serum, enthält unspezifische Serumhemmstoffe, hemmt den PERT-Assay um ca. den Faktor 10 gegenüber Pufferlösung. HIV positives Plasma, enthält unspezifische und spezifische Plasmahemmstoffe, hemmt den PERT-Assay nochmals nahezu um den Faktor 10.

Gerade der Versuchsaufbau Affinitätsbindung und Aufreinigung von HIV über HLA 2 Proteine (Anti-HLA-DR+DP+DQ Bindungsassay) erscheint auch bei kritischer Betrachtung der dargestellten Ergebnisse viel versprechend. Der Zeitaufwand für die Bearbeitung der Proben von Eingang bis Ergebnis der Real Time PCR beträgt ca. zwei Arbeitstage. Durch weitere Automatisierung der Arbeitsschritte, die bisher weitgehend manuell erfolgten, könnte weitere Arbeitszeit eingespart sowie Fehlerquellen minimiert werden. Um weitergehende Aussagen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität des Verfahrens tätigen zu können, ist eine Vermessung von Patientenplasmen mit genügend hoher Fallzahl und bekannten Viruslasten notwendig. Ob das hier entwickelte Verfahren einen Vergleich mit dem kommerziell vertriebenen Verfahren Exa VirTM Load Kit der Firma Cavid Tech AB, der HIV über Immobilisierung und an anionischen Ionen-Austauschmedien aufreinigt (Malmsen et al., 2003), standhält, müsste in größeren Versuchsreihen geprüft werden.

Anhang

A.1 Materialverzeichnis

- 96 Well-Platte schwarz, Roche Biochemicals, Best. Nr. 1734784
- Amplitaq Gold (Applied Biosystems Art.Nr. 4311806)
- Anti-DIG-POD, Roche Biochemicals, Best. Nr. 11207733910
- Antikörper (DAKO, Rabbit Anti-Human C3d Complement, Code No. A 0063)
- Antikörper: Anti-HLA-DR; Konz. 5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Clone: mouse; Überstand einer Dauerkulturlinie des Immunologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fr. Prof. Dr. Judith Johnson
- BMTU 3346 (Roche Biochemicals, Art.-Nr.:1775375)
- DNA Molekular Weight Marker V und VIII, Roche Biochemicals Best. Nr. 821705 und 1336045
- Dynabeads Pan Mouse IgG (Dynal, Dynabeads Pan Mouse IgG, Prod. No. 11042)
- FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix: Roche Biochemicals, Art.Nr. 3003248
- HLA-DR+DP+DQ Antikörper (Anti-HLA-DR+DP+DQ Antikörper, Pharmigen, Prod. Nr: 32381A)
- Human Complement Serum, Sigma Prod. Nr. S1764
- Luminol/Iodophenol, Roche Biochemicals, Best. Nr. 1582950
- MS2-RNA, Roche Biochemicals, Best-Nr.: 10165948001
- Protein-A Agarose (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 719 408)
- Raji-Zellen (B-Zell-Lymphom Linie)
- RNase DNase frei, Roche Biochemicals, Art.Nr. 1119915
- RT HIV-1, Roche Biochemicals, Art.-Nr.: 1465333

A.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
AZT	Azidothymidin
bp	Basenpaare
CFH	Komplement Faktor H
CR	Komplementrezeptor
CR1	Komplementrezeptor 1
CR2	Komplementrezeptor 2
CT	Cycle Threshold
DAF	decay-accelerating factor
DNA	Deoxyribonucleidacid
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HLA 1	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 1
HLA 2	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 2
MAC	Membranangriffskomplex
MEIA	Mikropartikel Enzyme Immuno Assay
MS2	Bacteriophage MS2
MVP 899	HIV Dauerkultur auf HUT78-Zellen; Laborstamm: MvP 899,HIV-1/M Subtyp B
NNRTI	nicht-nukleosidischer RT-Inhibitor
NRTI	nukleosidischer RT-Inhibitor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	polymerase chain reaction
PERT-Assay	Product Enhanced Reverse Transkriptase Assay
RLU	relative light units
RNA	Ribonucleidacid
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
UNG	Uracil-N-Glycosylase

Literaturverzeichnis

- Berger, A. und Preiser, W. (2002). Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(5):713–721.
- Biorama (2009).
- Böni, J., Pyra, H., und Schüpbach, J. (1996). Sensitive detection and quantification of particle-associated reverse transcriptase in plasma of HIV-1-infected individuals by the product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay. *Journal of Medical Virology*, 49(1):23–28.
- Braun, J., Plantier, J.-C., Hellot, M.-F., Tuailon, E., Gueudin, M., Damond, F., Malmsten, A., Corrigan, G. E., und Simon, F. (2003). A new quantitative HIV load assay based on plasma virion reverse transcriptase activity for the different types, groups and subtypes. *AIDS*, 17(3):331–336.
- Brodth, H. R., Kamps, B. S., Gute, P., Knupp, B., Staszewski, S., und Helm, E. B. (1997). Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS*, 11(14):1731–1738.
- Brust, S., Duttmann, H., Feldner, J., Gürtler, L., Thorstensson, R., und Simon, F. (2000). Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test. *Journal of Virological Methods*, 90(2):153–165.
- Busch, M. P. und Satten, G. A. (1997). Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *The American journal of medicine*, 102(5, Supplement 2):117–124.
- Cantin, R., Fortin, J.-F., und Tremblay, M. (1996). The Amount of Host HLA-DR Proteins Acquired by HIV-1 Is Virus Strain- and Cell Type-Specific. *Virology*, 218(2):372–381.
- Chang, A., Ostrove, J. M., und Bird, R. E. (1997). Development of an improved product enhanced reverse transcriptase assay. *Journal of Virological Methods*, 65(1):45–54.
- Clavel, F. und Hance, A. J. (2004). HIV Drug Resistance. *The New England journal of medicine*, 350(10):1023–1035.
- Dominique Schols, Rudi Pauwels, J. D. und Clercq, E. D. (1992). Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis. *Virology*, 189(1):374–376.

- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., und Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381:667–673.
- Ebenbichler, C. F., Thielens, N. M., Vornhagen, R., Marschang, P., Arlaud, G. J., und Dierich, M. P. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. *Journal of Experimental Medicine*, 174:1417–1424.
- Eberle, J. und Seibl, R. (1992). A new method for measuring reverse transcriptase activity by ELISA. *Journal of Virological Methods*, 40(3):347–356.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., und Berger, E. A. (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science*, 272(5263):872–877.
- Finzi, A., Brunet, A., Xiao, Y., Thibodeau, J., und Éric A. Cohen (2006). Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Promote Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly and Budding to Late Endosomal/Multivesicular Body Compartments. *Journal of Virology*, 80(19):9789–9797.
- Frank, I., Kacani, L., Stoiber, H., Stossel, H., Spruth, M., Steindl, F., Romani, N., und Dierich, M. P. (1999). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derived from Cocultures of Immature Dendritic Cells with Autologous T Cells Carries T-Cell-Specific Molecules on Its Surface and Is Highly Infectious. *Journal of Virology*, 73(4):3449–3454.
- Franklin, A., Milburn, P. J., Blanden, R. V., und Steele, E. J. (2004). Human DNA polymerase- η , an A-T mutator in somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes, is a reverse transcriptase. *Immunology and Cell Biology*, 82(2):219–225.
- García-Lerma, J. G., Schinazi, R. F., Juodawlkis, A. S., Soriano, V., Lin, Y., Tatti, K., Rimland, D., Folks, T. M., und Heneine, W. (1999). A Rapid Non-Culture-Based Assay for Clinical Monitoring of Phenotypic Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Lamivudine (3TC). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2):264–270.
- García-Lerma, J. G., Yamamoto, S., Gomez-Cano, M., Soriano, V., Green, T. A., Busch, M. P., Folks, T. M., und Heneine, W. (1998). Measurement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Plasma Virus Load Based on Reverse Transcriptase (RT) Activity: Evidence of Variabilities in Levels of Virion-Associated RT. *The Journal of Infectious Diseases*, 177:1221–1229.
- Hertogs, K., de Béthune, M.-P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., Cauwenberge, A. V., den Eynde, C. V., van Gerwen, V., Azijn, H., van Houtte, M., Peeters, F., Staszewski, S., Conant, M., Bloor, S., Kemp, S., Larder, B., und Pauwels, R. (1998). A Rapid Method for Simultaneous Detection of Phenotypic Resistance to Inhibitors of Protease and Reverse

- Transcriptase in Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Antiretroviral Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2):269–276.
- Hoffmann, C., Rockstroh, J. K., und Kamps, B. S., Hrsg. (2008). *HIV.NET 2008*. Steinhäuser Verlag.
- Joling, P., Bakker, L., Van Strijp, J., Meerloo, T., de Graaf, L., Dekker, M., Goudsmit, J., Verhoef, J., und Schuurman, H. (1993). Binding of human immunodeficiency virus type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent. *Journal of Immunology*, 150(3):1065–1073.
- Kusumi, K., Conway, B., Cunningham, S., Berson, A., Evans, C., Iversen, A. K., Colvin, D., M. V, G., Coutre, S., und Shpaer, E. G. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *Journal of Virology*, 66(2):875–885.
- Lennerstrand, J., Rytting, A.-S., Örvell, C., Gronowitz, J. S., und Källander, C. F. R. (1996). A Method for Combined Immunoaffinity Purification and Assay of HIV-1 Reverse Transcriptase Activity Useful for Crude Samples. *Analytical Biochemistry*, 235(2):141–152.
- Malmsten, A., Shao, X.-W., Aperia, K., Corrigan, G. E., Sandström, E., Källander, C. F. R., Leitner, T., und Gronowitz, J. S. (2003). Hiv-1 viral load determination based on reverse transcriptase activity recovered from human plasma. *Journal of Medical Virology*, 71(3):347–359.
- Mansky, L. M. und Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 69(8):5087–5094.
- Martin, G. und Tremblay, M. J. (2004). HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo. *Clinical Immunology*, 111(3):275–285.
- Meerloo, T., Sheikh, M. A., Bloem, A. C., de Ronde, A., Schutten, M., van Els, C. A. C., Roholl, P. J. M., Joling, P., Goudsmit, J., und Schuurman, H.-J. (1993). Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. *Society for General Microbiology*, 74:129–135.
- de Mendoza, C., Gallego, O., und Soriano, V. (2002). Mechanisms of Resistance to Antiretroviral Drugs – Clinical Implications. *AIDS Reviews*, 4(2):64–82.

- Montefiori, D. C., Graham, B. S., Zhou, J., Zhou, J., und Ahearn, J. M. (1994). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to the C3b/C4b receptor CR1 (CD35) and red blood cells in the presence of envelope-specific antibodies and complement. National Institutes of Health AIDS Vaccine Clinical Trials Networks. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(2):429–432.
- Montefiori, D. C., Kay Stewart, J. M. A., Zhou, J., und Zhou, J. (1993). Complement-mediated binding of naturally glycosylated and glycosylation-modified human immunodeficiency virus type 1 to human CR2 (CD21). *Journal of Virology*, 67(5):2699–2706.
- Montefiori, D. C., Zhou, J., und Shaff, D. I. (1992). CD4-independent binding of HIV-1 to the B lymphocyte receptor CR2 (CD21) in the presence of complement and antibody. *Clinical & Experimental Immunology*, 90(3):383–389.
- Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A., und Capon, D. J. (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*, 313:450–458.
- Nájera, I., Richman, D., Olivares, I., Rojas, J. M., Peinado, M. A., Perucho, M., Nájera, R., und López-Galíndez, C. (1994). Natural Occurrence of Drug Resistance Mutations in the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(11):1479–1488.
- Neumüller, M., Karlsson, A., Lennerstrand, J., Källander, C. F. R., Holmberg, V., Långström-Persson, U., Thorstensson, R., Sandström, E., und Gronowitz, J. S. (1991). HIV reverse transcriptase inhibiting antibodies detected by a new technique: Relation to p24 and gp41 antibodies, HIV antigenemia and clinical variables. *Journal of Medical Virology*, 34(1):55–63.
- Obermeier, M. (2006). *Optimierung und quantitative Auswertung eines hochsensitiven Reverse Transkriptase-Aktivitäts Assays*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., und Ho, D. D. (1996). HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science*, 271(5255):1582–1586.
- Prohászka, Z., Hidvégi, T., Ujhelyi, E., Stoiber, H., Dierich, M. P., Süsal, C., und G., G. F. (1995). Interaction of complement and specific antibodies with the external glycoprotein 120 of HIV-1. *Immunology*, 85(2):184–189.
- Pyra, H., Böni, J., und Schüpbach, J. (1994). Ultrasensitive Retrovirus Detection by a Reverse Transcriptase Assay Based on Product Enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4):1544–1548.

- Rossio, J. L., Bess, J., Henderson, L. E., und Arthur, P. C. L. O. (1995). HLA Class II on HIV Particles Is Functional in Superantigen Presentation to Human T Cells: Implications for HIV Pathogenesis. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(12):1433–1439.
- Saarloos, M. N., Sullivan, B. L., Czerniewski, M. A., Parameswar, K. D., und Spear, G. T. (1997). Detection of HLA-DR associated with monocytotropic, primary, and plasma isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 71(2):1640–1643.
- Sears, J. F., Repaske, R., und Khan, A. S. (1999). Improved Mg²⁺-Based Reverse Transcriptase Assay for Detection of Primate Retroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6):1704–1708.
- Senaldi, G., Peakman, M., McManus, T., Davies, E. T., Tee, D. E., und Vergani, D. (1990). Activation of the complement system in human immunodeficiency virus infection: relevance of the classical pathway to pathogenesis and disease severity. *The Journal of Infectious Diseases*, 162(6):1227–1232.
- Stoiber, H., Pinter, C., Siccardi, A. G., Clivio, A., und Dierich, M. P. (1996). Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55). *Journal of Experimental Medicine*, 183:307–310.
- The Protein Data Bank (2007).
- Trubey, C. M., Chertova, E., Coren, L. V., Hilburn, J. M., Hixson, C. V., Nagashima, K., Lifson, J. D., und Ott, D. E. (2003). Quantitation of HLA Class II Protein Incorporated into Human Immunodeficiency Type 1 Virions Purified by Anti-CD45 Immunoaffinity Depletion of Microvesicles. *Journal of Virology*, 77(23):12699–12709.
- UNAIDS (2008). Report on the global AIDS epidemic.
- Wikipedia (2009). Humanes Immundefizienz-Virus — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. [Online; Stand 26. Mai 2009].
- Zhou, J. und Montefiori, D. C. (1996). Complement-Activating Antibodies in Sera from Infected Individuals and Vaccinated Volunteers That Target Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Complement Receptor Type 1 (CR1, CD35). *Virology*, 226(1):13–21.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Eberle, für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken. Durch seine exzellente fachliche Betreuung ermöglichte er es mir, mich in die interessanten Themen meiner Dissertation einzuarbeiten und durch regen Dialog und konstantes Hinterfragen neue Ideen zu entwickeln.

Im Weiteren möchte ich meinem Bruder Rainer danken, der mir bei EDV-Problemen immer hilfreich zur Seite stand. Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die immer volles Vertrauen in meine universitäre Laufbahn setzten und diese überhaupt ermöglichten.

München, März 2010

Markus Opgen-Rhein