

**Variabilität der C-terminalen gag-Region  
des humanen Immundefizienzvirus 1  
unter antiretroviraler Therapie**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Elena Knops

aus Ermak

2009



Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Herbert Pfister  
Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Roth  
Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Einhard Schierenberg  
Beisitzer: Dr. rer. nat. Rolf Kaiser  
Tag der Disputation: 01. Juli 2009

Nichts in der Biologie ergibt Sinn, außer im Lichte der Evolution.

Theodosius Dobzhansky

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Das humane Immundefizienzvirus (HIV)</i>	1
1.2	<i>Infektionsverlauf bei HIV-1 und Pathogenese</i>	2
1.3	<i>HIV-1 Viruspartikel</i>	4
1.4	<i>Genomaufbau und HIV-1-Proteine</i>	5
1.4.1	<i>Das gag-Gen und die entsprechenden Gag-Proteine</i>	6
1.4.2	<i>Das pol-Gen und seine Genprodukte</i>	6
1.4.3	<i>Das env-Gen und seine Proteine</i>	9
1.4.4	<i>Die akzessorischen Gene und deren Proteine</i>	9
1.5	<i>Replikationszyklus</i>	10
1.6	<i>Antiretrovirale Therapie und Anpassung des HI-Virus</i>	12
1.6.1	<i>Wirkstoffklassen und Resistenz</i>	14
1.6.3	<i>Resistenzbestimmung</i>	18
1.7	<i>Ziele der Arbeit</i>	21
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
2.1	<i>Bakterienstämme</i>	22
2.2	<i>Eukaryotische Zellen</i>	22
2.3	<i>Patientencharakteristika</i>	22
2.4	<i>Nukleinsäuren</i>	23
2.4.1	<i>Synthetisch hergestellte Oligonukleotide</i>	23
2.4.2	<i>Synthetisch hergestellte Oligoribonukleotide</i>	24
2.4.3	<i>Reporterplasmide</i>	24
2.4.4	<i>DNA-Längenstandards</i>	25
2.5	<i>Enzyme und Enzyminhibitoren</i>	25
2.6	<i>Reagenzien</i>	26
2.6.1	<i>Reagenziensysteme</i>	26
2.6.2	<i>Puffer und Lösungen</i>	26
2.6.3	<i>Sonstige Chemikalien</i>	27
2.7	<i>Medien</i>	28
2.8	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	29
2.9	<i>Software zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten</i>	30
2.10	<i>Hilfsmittel im Internet</i>	30
2.11	<i>Datenbanken</i>	31
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	<i>DNA-Methoden</i>	32
3.1.1	<i>Isolierung viraler RNA</i>	32
3.1.2	<i>Reverse Transkription</i>	33

3.1.3	Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) .....	33
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.1.5	Quantifizierung der DNA .....	37
3.1.6	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	38
3.1.7	Sequenzreaktion .....	39
3.1.8	Aufreinigung der Sequenzprodukte .....	40
3.1.9	Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ 310 und 3130xl Genetic Analyzer .....	41
3.1.10	Methoden zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten .....	42
3.1.11	Plasmidpräparationen .....	43
3.1.12	<i>In vitro</i> Mutagenese .....	43
3.1.13	DNA-Standardmethoden .....	44
3.2	<b>Bakterienkultur</b> .....	<b>45</b>
3.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation .....	45
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien .....	45
3.2.3	Langzeitlagerung von Bakterien .....	45
3.2.4	Kulturen zur Plasmidisolierung .....	45
3.3	<b>„Frameshift“-Assay</b> .....	<b>46</b>
3.3.1	Konstruktion der Plasmide .....	46
3.3.2	Zellkulturmethoden .....	46
3.3.3	Transfektion der C33a-Zellen .....	46
3.3.4	Transiente Transfektion mittels der Calciumphosphat-Präzipitation .....	47
3.3.5	Ernte der transfizierten Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität .....	47
3.4	<b>Fitness-Assay</b> .....	<b>48</b>
3.4.1	Konstruktion der Plasmide .....	48
3.4.2	Herstellung rekombinanter infektiöser HIV-1 (Virusstocks) .....	48
3.4.3	Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration) .....	49
3.4.4	Wachstumskinetik einer <i>in vitro</i> HIV-Infektion .....	50
3.4.5	HIV p24-Antigen Assay .....	50
3.5	<b>siRNA-Assay</b> .....	<b>51</b>
3.5.1	Transfektion der C33a-Zellen .....	51
3.5.2	Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000 .....	51
3.5.3	Ernte der transfizierten Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität .....	51
3.6	<b>Statistische Analysen</b> .....	<b>52</b>
4	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
4.1	<b>Amplifikation und Sequenzierung des C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Bereichs</b> .....	<b>53</b>
4.2	<b>Änderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen der Protease in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten</b> .....	<b>54</b>
4.2.1	Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen in therapie-naiven Isolaten ohne primäre PR- und RT-Resistenzmutationen .....	54

4.2.2	Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen in therapie-naiven Isolaten mit primären PR- und RT-Resistenzmutationen .....	56
4.2.3	Unterschiede der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen von HI-Viren in therapie-naiven und -erfahrenen Patienten .....	56
4.2.4	Korrelationen der therapie-assoziierten CS-Mutationen mit resistenz-assoziierten Proteasemutationen .....	58
4.2.5	Therapie-assoziierte Schnittstellenmutationen bei therapie-naiven Isolaten aus den Jahren 1987-1990 .....	60
4.3	<i>Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich von HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten .....</i>	<i>62</i>
4.3.1	Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich von HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten des Subtyps B .....	62
4.3.2	Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten in der Subtypengruppe non-B .....	65
4.3.3	Insertionen und Deletionen im p1-Frameshiftbereich.....	68
4.4	<i>Bestimmung der Frameshifffizienz der p1-Bereiche der HI-Viren von therapie-naiven und therapie-erfahrenen Patienten .....</i>	<i>68</i>
4.4.1	Insertionen und Deletion .....	69
4.4.2	Polymorphismen.....	70
4.4.3	Signifikante Veränderungen außerhalb der Schnittstellen .....	71
4.4.4	Schnittstellenmutationen .....	72
4.4.5	Seltene Mutationen.....	73
4.4.6	Therapie-assoziierte Schnittstellenmutation I437V .....	74
4.4.7	Therapie-assoziierte Schnittstellenmutation L449F .....	75
4.5	<i>Bestimmung der in vitro Replikationskompetenz ausgewählter Isolate .....</i>	<i>76</i>
4.7	<i>Untersuchung der Wirksamkeit von siRNA in der C-terminalen gag-Region .....</i>	<i>78</i>
5	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
5.1	Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen der Protease in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten.....	82
5.2	Untersuchung des Frameshiftbereichs von HIV-Isolaten therapie-naiver und therapie-erfahrener Patienten und Analyse der Frameshifffizienz.....	90
5.3	Analyse der <i>in vitro</i> Replikationskompetenz therapie-naiver HI-Viren mit der therapie-assoziierten Schnittstellenmutation L449F.....	94
5.4	Wirksamkeit von siRNA in der C-terminalen gag-Region.....	95
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
7	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>106</b>
8	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
9	<b>Abstract .....</b>	<b>111</b>
10	<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>

<b>11</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>113</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

Die Beschreibung und Zusammenfassung der Symptome unter dem Begriff des erworbenen Immundefizienz-Syndroms (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) erfolgte erstmalig 1981 (Gottlieb *et al.*, 1981). Die Patienten, eine Gruppe homosexueller Männer in San Francisco, waren durch eine allgemeine Immunschwäche gezeichnet, die mit einer charakteristischen CD4<sup>+</sup>-Zellzahl-Verminderung einherging. Außerdem kam es bei diesen Patienten zu einer ungewöhnlichen Häufung von Lungenentzündungen (*Pneumocystis carinii* Pneumonien) und Hauttumoren (Kaposi-Sarkome) sowie einer Vielzahl von opportunistischen Infektionen, die nur bei Menschen mit verringerter Immunkompetenz auftraten.

Seit 1983 kennt man den dafür verantwortlichen Erreger, das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (*human immunodeficiency virus*, HIV-1). Das Virus wurde von zwei Arbeitsgruppen, der Arbeitsgruppe von Luc Montagnier am Pasteur Institut in Paris und der Arbeitsgruppe von Robert C. Gallo am National Institute of Health in Bethesda, aus den Lymphocyten von AIDS-Patienten isoliert (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984). Das HI-Virus lässt sich in die Familie der Retroviridae einordnen, die anhand morphologischer und genetischer Unterschiede in sieben Genera unterteilt wird, nämlich die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Retroviren sowie die Lentiviren und Spumaviren. Alle Vertreter dieser Familie zeichnen sich durch den Besitz eines einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrangorientierung und des viralen Enzyms reverse Transkriptase aus. Dieses befähigt die Retroviren dazu, die eigene virale RNA in DNA umzuschreiben, die dann als Provirus in das Wirtsgenom integriert wird.

Das HIV gehört zum Genus der Lentiviren (lat. *lentus*=langsam). Deren Besonderheit gegenüber den anderen Retroviren ist die Reifung des Viruspartikels erst nach der Abknospung.

Aufgrund von Sequenzunterschieden lässt sich HIV-1 in drei Hauptgruppen M, N und O einteilen, wobei die Hauptgruppe M in verschiedene Subtypen (A bis I) und weitere rekombinante Formen unterteilt wird (Gürtler *et al.*, 1994). In Westeuropa und den USA ist der Subtyp B vorherrschend. HIV-2 wurde erstmals 1986 aus dem Blut eines afrikanischen Patienten isoliert und ist vorwiegend in West-Afrika endemisch, so dass weltweit die meisten AIDS-Fälle von dem virulenteren HIV-1 verursacht werden.

## 1.2 Infektionsverlauf bei HIV-1 und Pathogenese

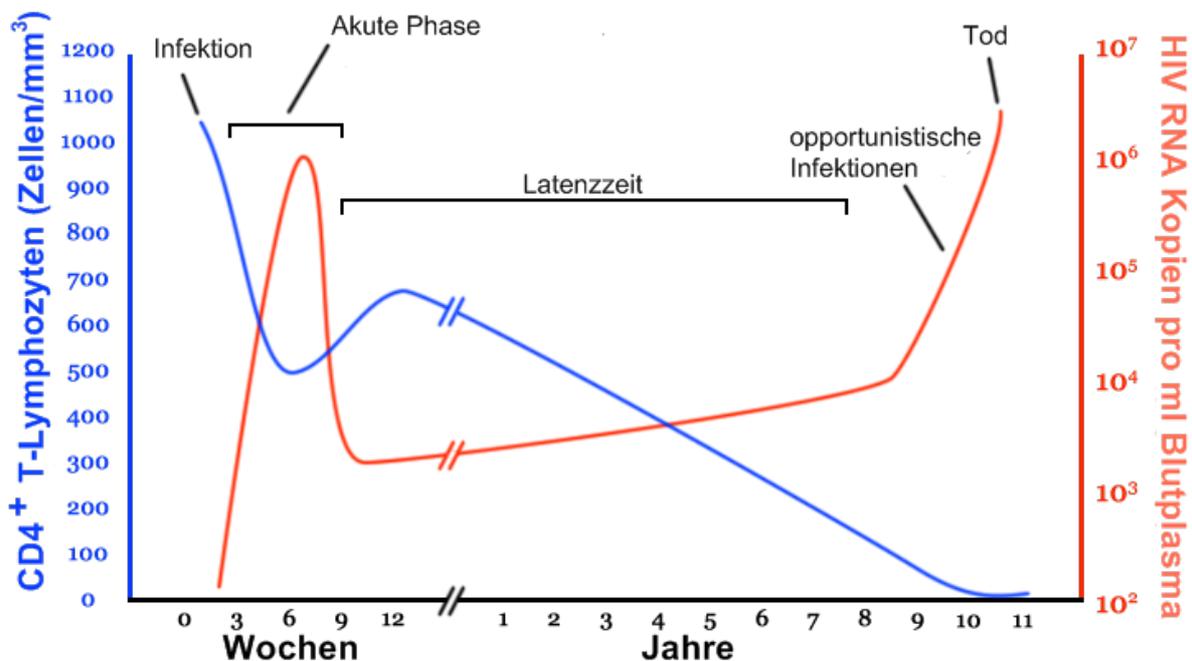
Eine Infektion mit HIV-1 erfolgt im Allgemeinen durch die Übertragung von Körperflüssigkeiten von einer infizierten Person, entweder direkt über das Blut oder über Verletzungen der Schleimhautbereiche (Modrow *et al.*, 1997). Das Virus befindet sich in infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Makrophagen oder frei im Blut, in der Samenflüssigkeit, den Vaginalsekreten, aber auch in der Muttermilch. Die ersten Zielzellen des Virus sind vermutlich die Langerhans-Zellen der Haut und Makrophagen, die in die Schleimhäute einwandern. Die infizierten Zellen wandern über die afferenten Lymphbahnen in die nächstliegenden Lymphknoten, die dann zum Reservoir für die Viren werden. Dort befindet sich ein Repertoire an Zellen, Monozyten, Makrophagen und primäre T-Lymphozyten, die durch die Expression der entsprechenden Rezeptoren einen idealen Vermehrungsort für die Viren darstellen. Hier werden auch die humorale und die zellvermittelte Immunantwort stimuliert.

Der Verlauf einer HIV-Infektion lässt sich in drei Phasen einteilen (Abbildung 1). Die erste Phase, die Primärinfektion, verläuft meist asymptomatisch. In einigen Fällen treten grippeähnliche Symptome innerhalb der ersten beiden Wochen auf. In dieser Phase der Infektion lassen sich aufgrund der starken Virusreplikation Virustiter von bis zu 10<sup>8</sup> Partikeln/ml im peripheren Blut nachweisen. Vorübergehend nimmt die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen signifikant ab. Diese akute Virämie ist bei praktisch allen Patienten mit einer Aktivierung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verbunden, die zu einer Zerstörung von HIV-infizierten Zellen führt (Janeway *et al.*, 1997). Nach mehreren Wochen mit dem Einsetzen der zellulären Immunantwort und der Bildung von HIV-spezifischen Antikörpern (Serokonversion) sinken die Virusmengen im peripheren Blut deutlich ab.

Darauf folgt die nächste Phase der HIV-Infektion, die Phase der klinischen Latenz, in der Krankheitssymptome meist ausbleiben. Während der Latenzphase findet eine aktive Virusreplikation statt und HIV-RNA lässt sich mittels einer quantitativen PCR nachweisen (Viruslast in Genomäquivalenten). Es werden täglich bis zu 10<sup>9</sup> neue infektiöse Viruspartikel gebildet und genauso viele CD4-positive Zellen zerstört (Ho *et al.*, 1995). Die Viren werden von dem noch kompetenten Immunsystem abgefangen und eliminiert. Wenn der Wert unter 10<sup>3</sup> Genomäquivalenten/ml Blut liegt, zeigen die betroffenen Patienten meist eine sehr lange asymptomatische Phase, die bis zu 15 Jahren dauern kann.

Der Übergang in die symptomatische Phase wird durch das Zusammenbrechen des Gleichgewichts zwischen Virusreplikation und Immunabwehr ausgelöst. Als Folge der fortschreitenden Virusreplikation sinkt die Zahl der CD4-positiven Zellen langsam ab und die Viruslast steigt an. Als Grund hierfür wird der programmierte Zelltod (Apoptose) diskutiert (Jaworowski *et al.*, 1999). Aufgrund des ständig ausgeübten Selektionsdruckes durch das

Immunsystem und der hohen Mutationsrate des Virus wird der Abwehrmechanismus des Immunsystems umgangen. Die Viren verändern nicht nur die Epitope für die humorale und zelluläre Immunreaktion, sondern ändern auch ihre Replikationseigenschaften und den Zelltropismus. Sie replizieren schneller, induzieren Synzytien und stellen damit hochvirulente Virusvarianten dar, die der Immunantwort entgehen (Connor *et al.*, 1993). Sie vermehren sich explosionsartig in lymphatischen Geweben und zerstören diese. Im Infektionsverlauf werden mehr CD4-positive Zellen zerstört als nachgebildet. So ist das Immunsystem immer weniger in der Lage, nicht nur die HIV-Vermehrung selbst, sondern auch andere opportunistische Infektionen zu kontrollieren. Es kommt zur Ausbildung von AIDS-definierenden Erkrankungen (Candidainfektionen [Bronchien, Trachea, Lunge, Ösophagus], Zervixkarzinome, HSV-Infektionen [chronisch ulzerativ, Bronchitis, Pneumonie, Ösophagitis], Burkitt-Lymphome usw.).

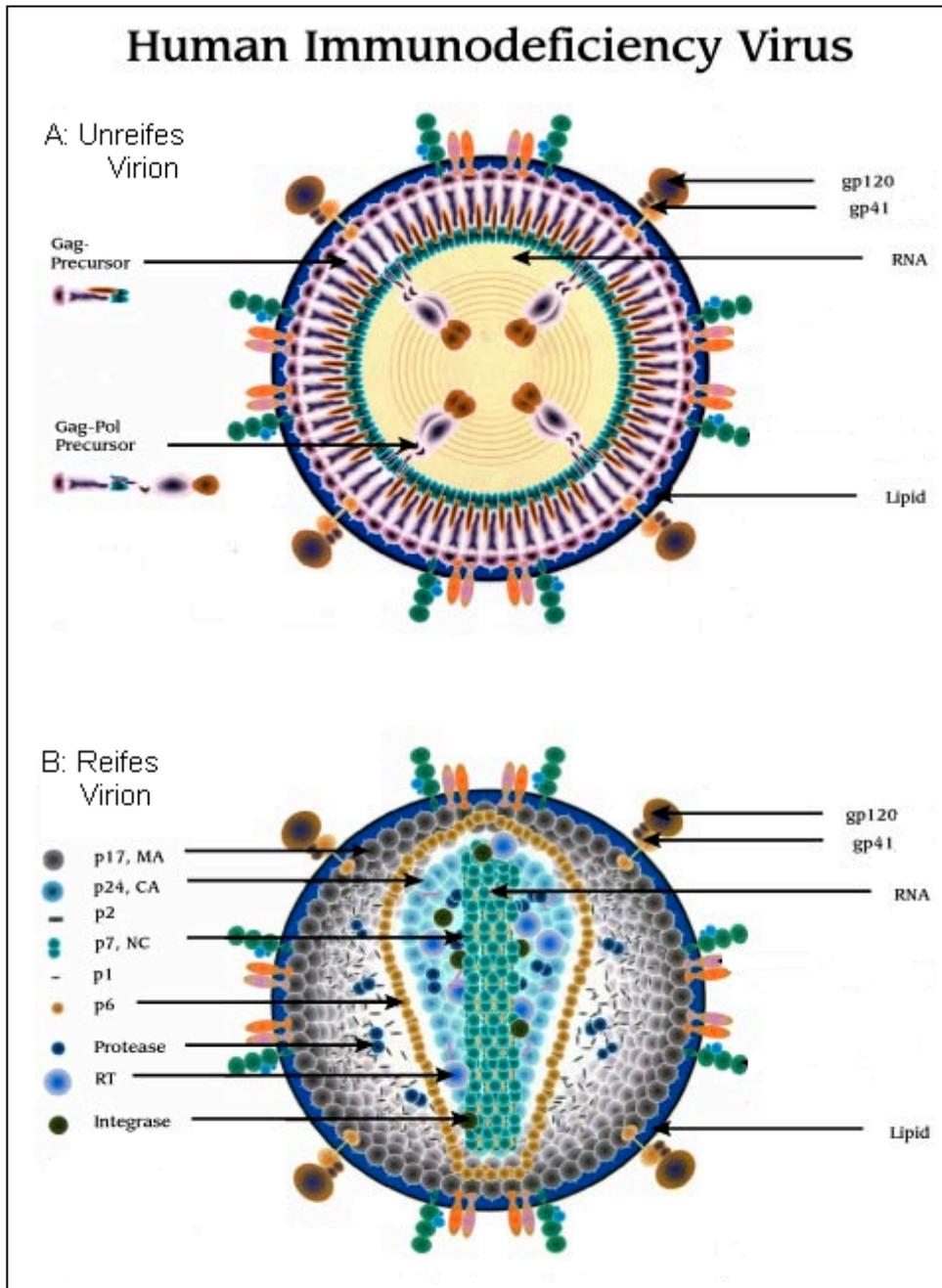


**Abbildung 1: Typischer Verlauf der HIV-Infektion.** Der kurzzeitigen Virämie in der akuten Phase mit hoher Konzentration viraler RNA folgt eine eventuell über mehrere Jahre andauernde Latenzphase. Mit dem Anstieg der Viruslast und der Abnahme der CD4<sup>+</sup>-Lymphocyten kommt es zur Ausbildung von AIDS begleitet von charakteristischen opportunistischen Infektionen.

Seit 1993 gelten für die Klassifizierung der HIV-Erkrankung in Infektionsstadien die Kriterien der Centers for Disease Control (CDC). Danach wird die HIV-Infektion nach klinischen Daten und der Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten charakterisiert.

### 1.3 HIV-1 Viruspartikel

Das reife HIV-1-Partikel (Abbildung 2) hat eine Kugelstruktur und einen Durchmesser von 100-120 nm. Das konische Nukleokapsid wird von einer Lipid-Doppelmembran umhüllt, die aus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle hervorgeht.



**Abbildung 2: Morphologie des unreifen und reifen Virions von HIV-1.** A: Das unreife Virion. Dargestellt sind Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine, die Oberflächen-Glykoproteine gp120 und gp41, die Lipiddoppelmembran und die RNA im Zentrum. B: Das reife Virion. Zu sehen sind die Gag- als auch die Pol-Proteine in ihrer prozessierten Form, die Env-Proteine gp120 und gp41 und die komplexierte RNA. (nach Henderson und Arthur).

Die Partikeloberfläche besitzt um die 70 sogenannte Spikes, die von je drei Heterodimeren der viralen Glykoproteine gp120 und gp41 gebildet werden. Direkt unter der Membran liegt das Matrixprotein (p17 oder MA), in welches das Nukleokapsid (Core) eingebettet wird. Die Struktur des Cores wird durch das Protein p24 (Kapsidprotein, CA) vorgegeben.

Das Kapsid enthält zwei Kopien der genomischen, einzelsträngigen, 9,2 kb großen RNA-Moleküle, die nicht miteinander verbunden sind sowie die unterschiedlichen virus-spezifischen Enzyme (Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN)). Darüber hinaus beinhaltet das Kapsid das akzessorische Protein vpr sowie die Proteine p6-gag, das die Verbindung zwischen Kapsid und Hüllmembran herstellt (Link-Protein), p6-pol, p1 und p2. Die RNA-Stränge werden während der Kapsidbildung durch das Protein p7 (Nukleokapsidprotein, NC) stabilisiert.

### 1.4 Genomaufbau und HIV-1-Proteine

Das Genom des HIV-1 weist alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Dazu gehören beispielsweise die 5'-Cap-Struktur und die 3'-Polyadenylierung. Es enthält neun offene Leseraster (open reading frames, ORF) und codiert für die Produkte Gag (gruppen-spezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten), Env (Glykoproteine) und weitere regulatorische und akzessorische Proteine (Abbildung 3). In erster Linie handelt es sich um Polyproteine, die proteolytisch in einzelne Proteine gespalten werden.

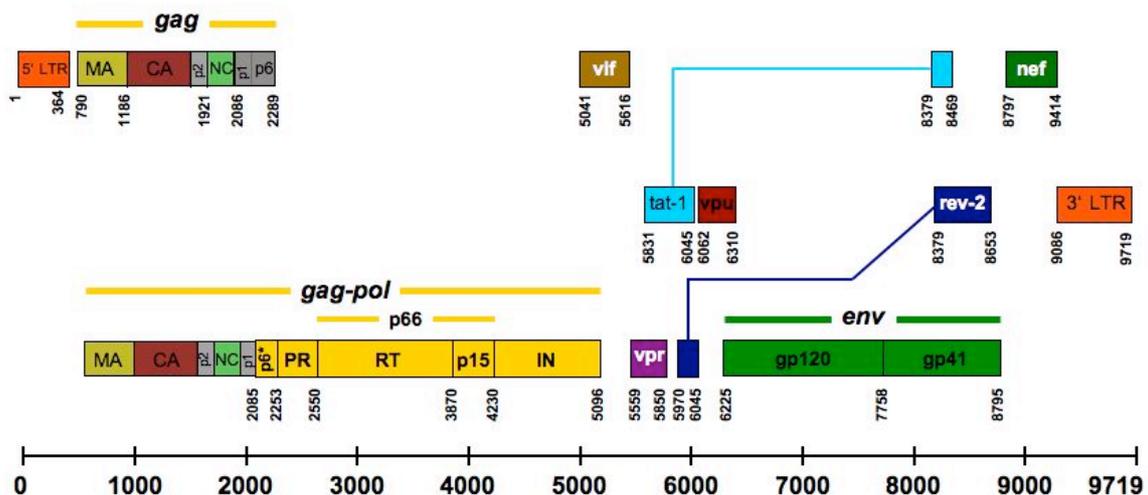


Abbildung 3: Genomaufbau von HIV-1 (nach Sierra-Aragon, 2008).

Nach der reversen Transkription wird das Genom als 9,8 kb große, doppelsträngige DNA in das Wirtszellgenom integriert. Die identischen Sequenzfolgen an den beiden Enden des

proviralen Genoms, die erst im Verlauf des Umschreibens der RNA in die DNA generiert werden, auch *long terminal repeats* (LTR) genannt, enthalten *cis*-aktive Sequenzen, die Promotor- und Enhancer-Elemente, die die retrovirale Genexpression kontrollieren.

#### **1.4.1 Das gag-Gen und die entsprechenden Gag-Proteine**

Das gag-Gen kodiert für die bereits unter 1.3 erwähnten Proteine p17, p24, p7, p6-gag sowie zwei Spacerpeptide p2 und p1. Alle Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprodukt synthetisiert, an die Zellmembran rekrutiert und erst im Verlauf der Reifung, kurz nach der Abschnürung von der Zellmembran, durch die Protease in die einzelnen Komponenten gespalten. Die proteolytische Spaltung des Gag-Vorläuferproteins induziert eine Umstrukturierung des Virions.

Das am Aminoterminus myristoylierte Matrixprotein (MA, p17) ist verantwortlich für die Assoziation der Gag-Vorläuferproteine mit der Plasmamembran und die Angliederung der Env-Glykoproteine (Bryant *et al.*, 1990).

Die kegelförmige Kernhülle der Viruspartikel wird von dem Capsidprotein (CA, p24) gebildet. Die CA-Domäne im Gag-Vorläuferprotein spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Interaktion der verschiedenen Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine untereinander.

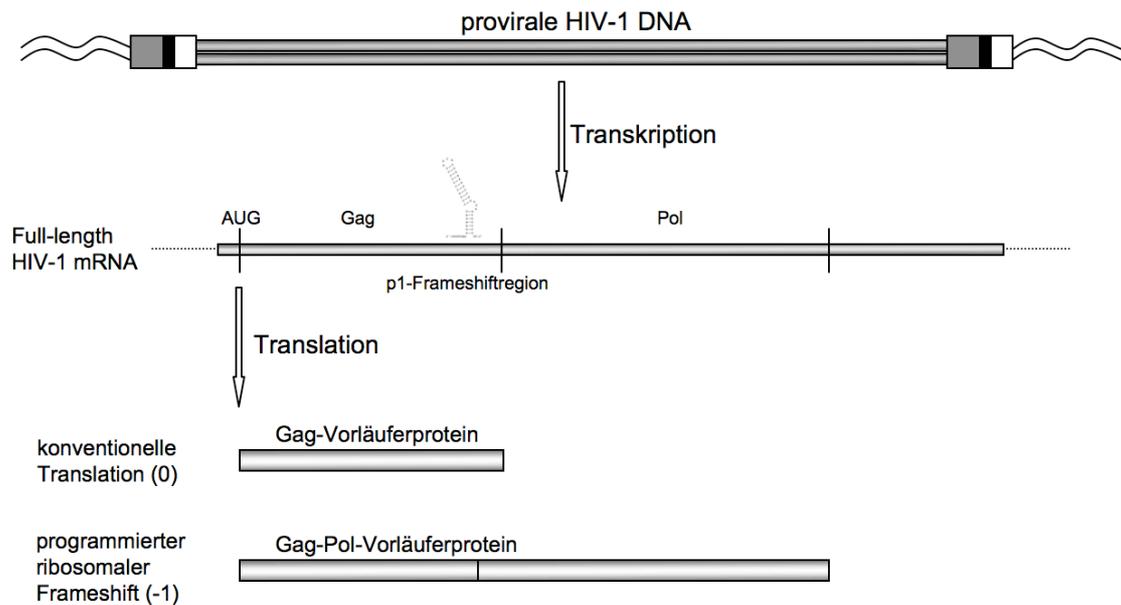
Das basische Nukleocapsidprotein (NC, p7) umhüllt die virale RNA. Es enthält zwei Zinkfinger motive (Cystein-Histidin-Motiv), die an eine spezifische Signalsequenz in der RNA binden und so zu einer Inkorporation der RNA-Partikel in das Virion führen.

p6-gag enthält am N-terminalen Ende das PTAP-Motiv, auch L-Domäne (*late*) genannt, das für das Ablösen (*budding*) der frisch gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche verantwortlich ist (Huang *et al.*, 1995).

Die genauen Funktionen der beiden Peptide p1 und p2 konnten bisher noch nicht geklärt werden, wobei p1 auf der RNA-Ebene wichtige Funktionen in der Virusreplikation übernimmt, genauer in den Kapiteln 1.4.3 und 1.5. Außerdem wird vermutet, dass diese beiden Spacerpeptide die Proteolyserate an den entsprechenden Schnittstellen der Protease regulieren und dadurch die Reihenfolge der Prozessierung beeinflussen (Freed, 1998).

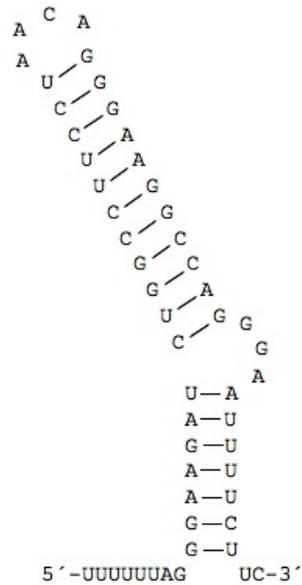
#### **1.4.2 Das pol-Gen und seine Genprodukte**

Das pol-Gen schließt an das 3'-Ende des gag-Gens an, wobei die p1/p6-gag-Region überlappt wird, und kodiert für die viralen Enzyme Protease, reverse Transkriptase und Integrase. Auch diese werden zunächst als Vorläuferprotein synthetisiert, jedoch nur in Verbindung mit dem Gag-Vorläuferprotein (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Biosynthese der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine.** Aus der integrierten proviralen HIV-1 DNA wird eine full-length mRNA transkribiert. Bei der darauffolgenden konventionellen Translation wird das Gag-Vorläuferprotein hergestellt. In ca. 5% aller Translationsereignisse kommt es jedoch aufgrund eines uridinreichen Abschnitts sowie einer Sekundärstrukturausbildung der RNA in Form einer Haarnadel in der p1-Region zu einer Leserasterverschiebung um -1, wodurch das Stoppkodon am Ende des gag-Bereichs übersprungen und ein Gag-Pol-Vorläuferprotein synthetisiert wird.

Zu diesem Fusionsprotein kommt es nur bei einer Leserasterverschiebung während der Translation. Dies geschieht in ca. 5 % der gesamten Translationsvorgänge, wodurch die gebildete Menge an Enzymen kontrolliert und limitiert wird. Die Verschiebung des Leserasters bzw. der Frameshift beruht auf einer fehlerhaften Erkennung der Kodongrenzen durch die Ribosomen. Voraussetzung hierfür sind sowohl eine uridinreiche Region der mRNA, die im p1-Bereich liegt, die sogenannte slippery site, als auch eine anschließende, spezielle Sekundärstruktur, ein Stem-Loop oder Hairpin, deren genaue Form kontrovers diskutiert wird (Gaudin *et al.*, 2005). Einer der gängigsten Hypothesen zufolge besteht dieser Hairpin aus einer Helix, die durch eine Schleife in einen oberen und unteren Stamm aufgeteilt wird, sowie einer Schleife am oberen Ende des Hairpins (Abbildung 5) (Dulude *et al.*, 2002). Diese Struktur führt zu einer Verlangsamung der Proteinsynthese an dieser Stelle und zum „Verrutschen“ des Ribosoms an der uridinreichen Region um -1. In dem Fall wird das Stoppcodon zur Beendigung der Synthese des Gag-Vorläuferproteins überlesen, wodurch neue Proteine entstehen, das Transframe-Protein von nur acht Aminosäuren, p6-pol und die viralen Enzyme PR, RT und Integrase (Parkin *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993; Brierley, 1995).



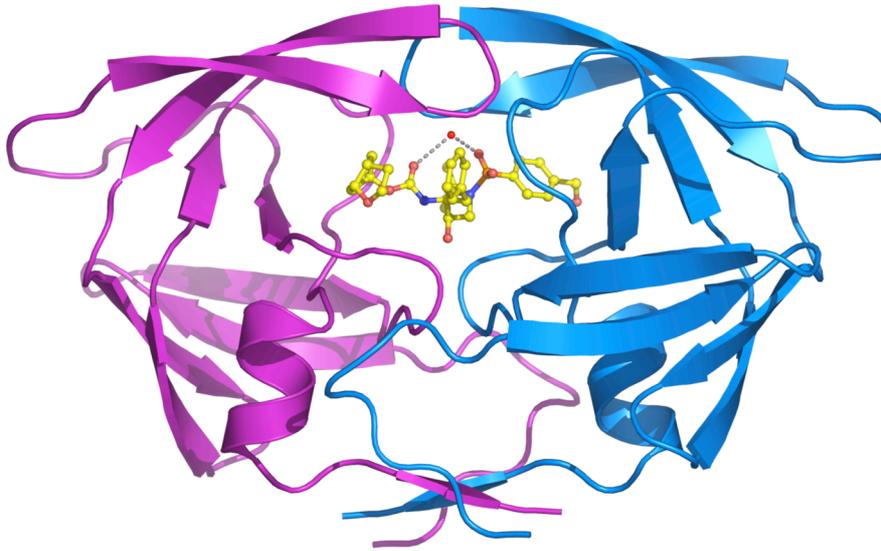
**Abbildung 5: HIV-1 Frameshiftsignal.** Die mRNA-Sekundärstruktur besteht aus einer slippery site (UUUUUUA) und einer Helix, die durch eine Schleife in eine untere und obere Helix aufgeteilt wird. Es wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen der Struktur und dem Ribosom stattfindet (Dulude *et al.*, 2002).

Auch die Gag-Pol-Fusionsproteine werden, genau wie die Gag-Vorläuferproteine, erst nach dem Abschnüren des Viruspartikels durch die Protease, die sich zunächst selbst (autokatalytisch) aus dem Vorläufer befreit, in die enzymatisch aktiven Einzelkomponenten gespalten.

Die Protease gehört zu den Asparaginsäure-Proteasen und erreicht nur als Homodimer aus zwei 99-AS großen Untereinheiten ihre volle Aktivität (Abbildung 6). Diese ist essentiell für die Reifung der Viruspartikel, die erst nach der Maturation infektiös werden (von der Helm, 1996). Die Protease spaltet bevorzugt zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten. Zusätzlich spielt die dreidimensionale Struktur der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine für die Erkennung der Schnittstellen eine wichtige Rolle.

Die reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige DNA umschreibt. Sie besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, wobei eine von ihnen zusätzlich über eine RNase-H-Aktivität verfügt. Die RNase-H baut den RNA-Anteil von DNA-RNA-Hybriddoppelsträngen ab. Die RT verfügt über keine „proof reading“-Mechanismen, aufgrund einer fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität, was zu einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit ( $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$ ) für den Einbau nicht komplementärer Basen führt. Dies erklärt die hohen Mutationsraten von HIV, man findet eine enorme Populationsdynamik und schnelles Auftreten von Quasispezies.

Die Integrase ist ein Tetramer, welches die doppelsträngige, provirale DNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle einbaut (Knipe *et al.*, 1996). Die Integrase verfügt sowohl über Restriktions- als auch Ligationsaktivität.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Homodimers der HIV-Protease.** Das katalytische Zentrum wird von einem Proteaseinhibitor besetzt. (Wedekind, University of Rochester).

### 1.4.3 Das env-Gen und seine Proteine

Das env-Gen (engl. envelope = Hülle) kodiert für das Vorläuferprotein gp160, das dann zu zwei weiteren, gp120 und gp41, prozessiert wird, wobei gp120 die CD4-Bindungsdomäne enthält und gp41 die Fusion der beiden Membranen, der viralen mit der zellulären Lipiddoppelschicht, vermittelt. Diese beiden bilden mittels nicht-kovalenter Bindungen ein Heterodimer. Drei solche Einheiten, das Env-Glykoprotein, bilden einen Rezeptor für CD4<sup>+</sup>-Zellen an der Virionoberfläche. Die Env-Proteine stellen die Hauptantigene für die Immunantwort dar.

### 1.4.4 Die akzessorischen Gene und deren Proteine

Das HIV-1 enthält mindestens sechs sogenannte akzessorische Gene: tat, rev, vif, nef, vpr und vpu, deren Proteine ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen, von Transkriptionsaktivierung durch tat, über eine schnelle Herabregulierung von CD4- und MHC-Klasse-I-Antigenen durch Endozytose durch nef bis zur Beteiligung am Transport des Prä-Integrationskomplexes aufgrund von Kernlokalisationssequenzen in den Zellkern (vpr) (Heinzinger *et al.*, 1994).

## 1.5 Replikationszyklus

### **Anlagerung des Virus an die Zelle und Membranfusion**

Die Adsorption wird durch das Env-Protein vermittelt. gp120 enthält die Bindungsdomänen für den CD4- und einen Korezeptor (Chemokinrezeptor), entweder CCR5, auf Makrophagen, oder CXCR4, nur auf T-Lymphozyten. Der CD4-Rezeptor stammt aus der Immunglobulinsuperfamilie und wird hauptsächlich auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (T-Helferzellen), Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, die dadurch auch zu Zielzellen des HI-Virus werden.

Nach der Anlagerung von gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor führt eine dadurch induzierte Konformationsänderung zur Interaktion der V3-Schleife, einer von 5 variablen Regionen des gp120-Proteins, mit dem Korezeptor. Dieser Kontakt löst eine weitere Konformationsänderung aus, wobei das Transmembranprotein gp41 über eine Fusionsdomäne mit der Zellmembran in Berührung kommt. Dies leitet die Verschmelzung der Membranen ein. Das Kapsid samt Inhalt wird in das Zytoplasma entlassen (Abbildung 7, ①–③).

### **Reverse Transkription**

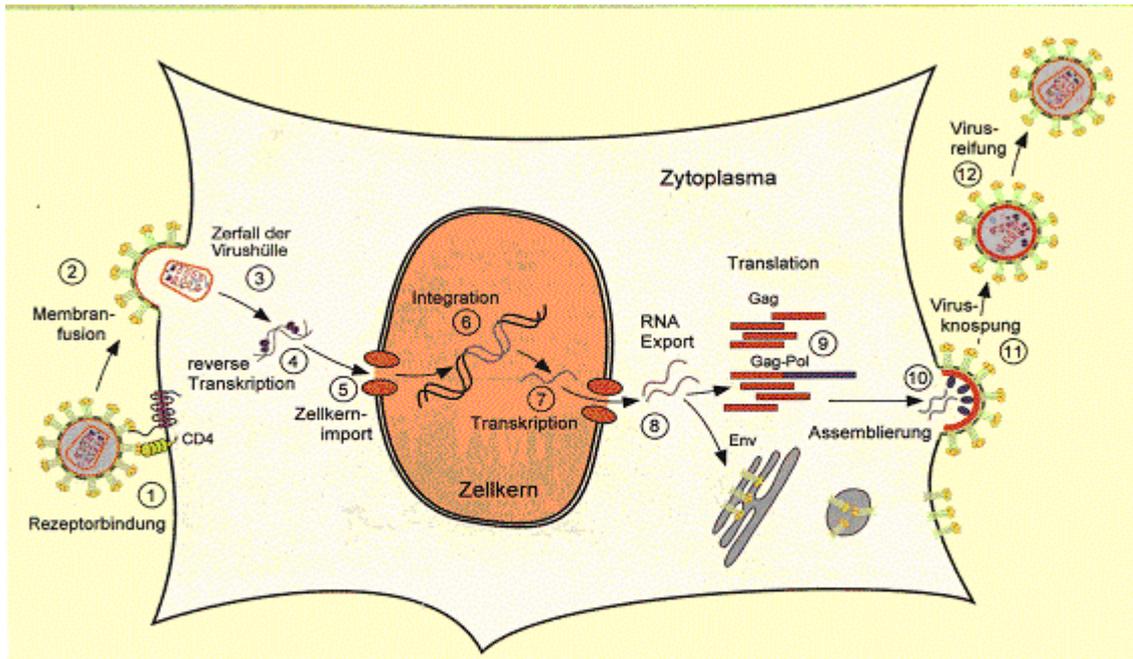
Nach dem Auflösen des Nukleokapsids bildet sich ein „Reverser Transkriptionskomplex“. Dabei wird die einzelsträngige, virale RNA durch die RT in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Verlauf des Umschreibens entstehen an den Enden identische Sequenzfolgen, die bereits erwähnten LTR-Regionen, die die Kontrollelemente der retroviralen Expression enthalten (Abbildung 7, ④).

### **Integration**

Das nun doppelsträngige DNA-Virusgenom mitsamt den gebundenen Proteinkomponenten p17, RT, IN, vpr und zusätzlichen zellulären Proteinen wird als Präintegrationskomplex mittels Kernlokalisierungssignalen in den Zellkern transportiert. Im Zellkern angelangt, wird die virale DNA, von der Integrase katalysiert, in das Genom der Wirtszelle integriert (Whitcomb *et al.*, 1992). Das integrierte Provirus kann nun in eine Phase genetischer Latenz eintreten oder mit der Replikation fortfahren (Abbildung 7, ⑤–⑥).

### **Transkription**

Die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II, wobei sie von verschiedenen zellulären und viralen Regulatoren kontrolliert wird. Die mehrfach gespleißten mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert, wobei diese Prozesse vom viralen Protein rev reguliert werden, und dort translatiert. Es entstehen aber auch komplette Transkripte der proviralen DNA, die als genomische RNA-Moleküle für die neuen Viruspartikel benötigt werden (Abbildung 7, ⑦–⑧).



**Abbildung 7: Replikationszyklus von HIV-1.** (Verändert nach Fakler und Geyer. Aus: Biologie in unserer Zeit, 2002).

### Translation

Die verschiedenen mRNAs werden im Zytoplasma translatiert. Dabei entstehen nicht nur Gag-Proteine, sondern aufgrund eines Frameshift-Ereignisses in der p1-Region der mRNA (siehe Kapitel 1.4.2) auch Gag-Pol-Fusionsproteine.

Die regulatorisch aktiven Proteine wie z.B. tat, rev, und nef werden in den Zellkern transportiert und führen dort sowohl zur erhöhten Transkription als auch zur Bildung ungespleißter und gespleißter mRNAs (Abbildung 7, ⑨).

### Zusammenlagerung und Abknospen

Die Env-Proteine werden an der Membran des endoplasmatischen Reticulums synthetisiert, glykosyliert und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Nach der Anlagerung bzw. Assemblierung aller weiteren viralen Proteine und Proteinvorläufer sowie der RNA-Moleküle an der Zellmembran und Kontakt mit den RNA-Molekülen werden die entsprechenden Membranbereiche mit einer besonders hohen Konzentration von gp120 und gp41 nach außen gestülpt („budding“). Dabei wirkt das PTAP-Motiv in p6-gag als Interaktionspartner für die zellulären Proteine Tsg101, Nedd4-ähnliche Ubiquitinligasen und AP2 (Bouamr *et al.*, 2003) (Abbildung 7, ⑩–⑪).

### Maturation

Die abschließende Reifung des Virus wird durch die Protease eingeleitet. Bedingt durch die hohe lokale Konzentration der Gag-Pol-Vorläuferproteine sowie einem leicht sauren pH (6-6,2) können die Proteasedomänen erst im abgeschnürten Partikel dimerisieren und sich autokatalytisch abspalten. Dadurch, dass die Protease erst nach der Abknospung aktiv wird,

wird eine korrekte Morphogenese und Assemblierung der Proteine und RNA-Genome an der Membran gewährleistet. Wenn sie zu früh aktiviert wird, kommt es nicht zur Ausbildung von HIV-1-Partikeln (Karacostas *et al.*, 1993).

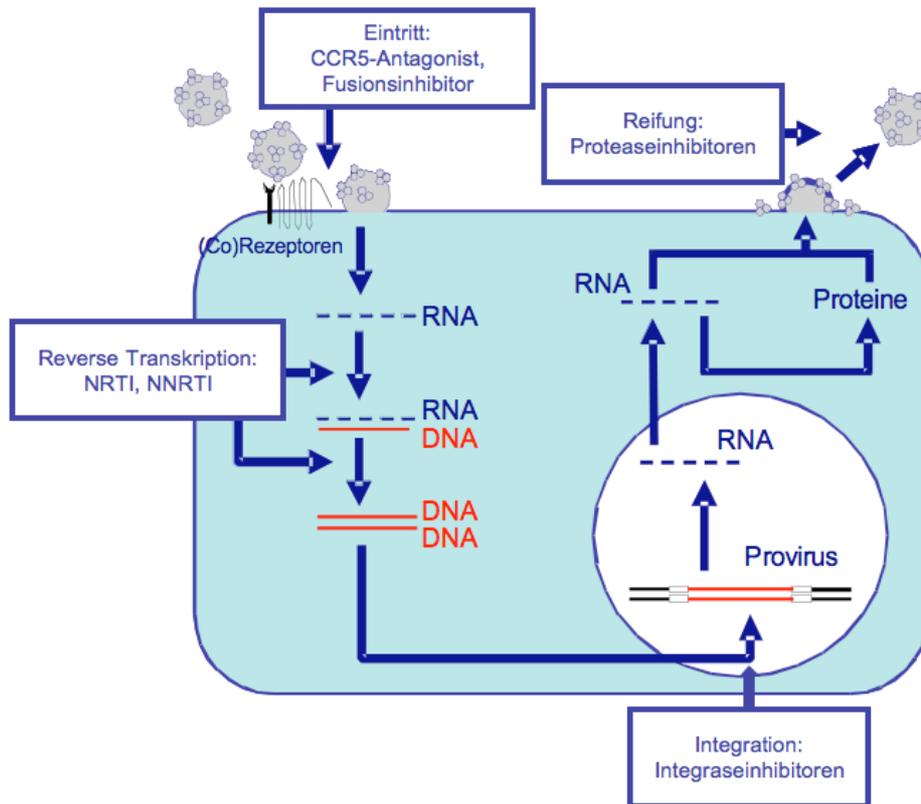
Anschließend werden die Gag- und Gag-Pol-Vorläufer in die bereits oben erwähnten Gag- und Pol-Proteine prozessiert. Die Proteolyse bewirkt einige strukturelle Umlagerungen wie die Ausbildung des konischen Kapsids usw. Letztendlich entsteht nach der Reifung ein infektiöses Virion (Abbildung 7, ⑫).

Die Spaltung der Schnittstellen durch die Protease erfolgt dabei nicht in willkürlicher Reihenfolge, sondern ist ein streng hierarchischer Vorgang. Die Schnittstelle p2/p7 wird als erste gespalten, anschließend die sekundären Schnittstellen p17/p24 und p1/p6-gag und zum Schluss die tertiären Schnittstellen p24/p2 und p7/p1 (Pettit *et al.*, 1994). Die p7/p1- und p1/p6-gag-Schnittstellen werden demnach erst spät durch die Protease geschnitten (Doyon *et al.*, 1996) und es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Schnittstellen keine idealen Eigenschaften für die Prozessierung durch die virale Protease aufweisen. In der Virusreplikation verhindert diese suboptimale Prozessierungskinetik einen zu frühen Abschluss des Reifungsprozesses, der teilweise mit dem Entstehen von nicht infektiösen Viruspartikeln korreliert werden konnte.

## 1.6 Antiretrovirale Therapie und Anpassung des HI-Virus

Die HIV-Infektion wird seit 1985 mit einer antiretroviralen Therapie (ART) behandelt. Eine möglichst dauerhafte Suppression der Virusreplikation mit einer Absenkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze von 40 bzw. 50 Kopien/ml Plasma, ist das angestrebte Ziel der behandelnden Ärzte.

Dafür stehen heute vier verschiedene Medikamentenklassen zur Verfügung, die unterschiedliche Schritte bzw. Proteine des viralen Replikationszyklus zum Ziel haben (Abbildung 8). Dazu gehören die RT-Inhibitoren, die wiederum aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen in NRTI (nukleosidische/nukleotidische RT-Inhibitoren = Nukleosidanaloga) und NNRTI (nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren) aufgeteilt werden. Weitere Medikamentenklassen sind PI (Proteaseinhibitoren), Eintrittsinhibitoren (CCR5-Korezeptorantagonist und Fusionsinhibitor) und neuerdings auch Integraseinhibitoren. In der Entwicklung sind unter anderem auch Maturationsinhibitoren, die eine Spaltung an der Schnittstelle p24/p2 verhindern.



**Abbildung 8: Angriffspunkte der antiretroviralen Therapie.**

Die antiretroviralen Medikamente werden routinemäßig in einer Dreierkombination eingesetzt, um verschiedene Angriffspunkte auf die Virusreplikation in einem Therapiekonzept zu vereinen. Diese Kombinationstherapie wird auch die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) genannt. Diese kann den klinischen Verlauf der HIV-Infektion deutlich verzögern und so die HIV-assoziierte Morbidität und Mortalität reduzieren (Hammer *et al.*, 1999). Die HAART besteht in der Regel aus zwei NRTI in Kombination mit einem NNRTI oder ein bis zwei PI. Es wird ein individualisiertes Therapiekonzept angestrebt, bei dem die viralen Besonderheiten (Medikamentenresistenz) als auch die unterschiedliche Verträglichkeit der Medikamente berücksichtigt werden. Veränderungen von HIV, die zu einer Unwirksamkeit der eingesetzten Medikamente führen, gehören zu den wichtigsten Ursachen für ein Therapieversagen. Die hohe Variabilität von HIV begünstigt das Entstehen von Resistenzmutationen, die unter fortgesetzter antiretroviraler Therapie selektiert werden. Durch die hohe Fehlerrate der reversen Transkriptase von HIV enthält statistisch jedes neu kopierte HIV-Genom mindestens eine Punktmutation. Als besonders risikoreich für das Auftreten von resistenz-assoziierten Mutationen wird die Virusreplikation bei subtherapeutischer Konzentration der verschiedenen Medikamente erachtet. Bei einer nicht vollständig unterdrückten Virusreplikation entsteht eine große Anzahl unterschiedlicher Quasispezies, wobei sich diejenigen Spezies durchsetzen bzw. zum prädominanten Stamm werden, die einen Replikationsvorteil in Anwesenheit von Medikamenten haben (Drake, 1993; Clavel *et*

*al.*, 2004). Die resistenten Quasispezies werden unter medikamentösem Druck selektiert, obwohl ihre Replikationsfähigkeit im direkten Vergleich ohne Medikamentenexposition häufig geringer als die des Wildtyps ist. Es findet eine rasche Evolution im Mikrokosmos des HI-Virus statt. Häufig reicht nur eine Punktmutation, um Resistenz zu erreichen. Eine fortlaufende Vermehrung der resistenten, in ihrer Replikation beeinträchtigten Viren erlaubt die Akquirierung weiterer Mutationen, die kompensatorisch wirken können und somit die Replikationsfähigkeit steigern. So kann ein resistentes Virus die Replikationsfähigkeit des Wildtyp-Virus erreichen.

Die Ursachen für suboptimale Wirkstoffspiegel können z.B. in eingeschränkter Adhärenz der Patienten oder mangelnder Bioverfügbarkeit der Substanzen liegen (Oette *et al.*, 2003). Die Langzeitprognose von Patienten unter HAART wird ganz entscheidend vom Auftreten dieser Mutationen im HIV-Genom limitiert.

### **1.6.1 Wirkstoffklassen und Resistenz**

Eine Resistenz von HIV-1 gegenüber den verschiedensten, im Folgenden aufgeführten Inhibitoren äußert sich meist darin, dass eine Bindung des Inhibitors entweder verhindert oder zumindest erschwert wird, die biologische Funktion des Proteins jedoch noch erhalten wird.

#### **Nukleosidische/Nukleotidische RT-Inhibitoren (NRTI)**

Die NRTI sind Analoga der DNA-Bausteine Cytidin, Guanosin, Adenosin oder Thymidin. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass ihnen die Hydroxylgruppe an der 3'-Position der Desoxyribose, die für die Kettenverlängerung bei der DNA-Synthese notwendig ist, fehlt. Die reverse Transkriptase kann nicht fortfahren und da ihr die Kontrollfunktion für den korrekten Einbau fehlt, kann die Bildung des Provirus nicht fortgesetzt werden und die Infektionskette wird unterbrochen.

Die verschiedenen Resistenzmechanismen des Virus bei dieser Wirkstoffklasse können z.B. auf der Diskriminierungsfähigkeit der RT gegenüber den NRTI oder einer Erhöhung der Rate der hydrolytischen Spaltung der eingebauten NRTI beruhen (Loveday, 2001; Ray *et al.*, 2002). Mutationen, wie z.B. M184V oder K65R, verhindern die sterische Inhibition, so dass der Einbau der Inhibitoren zugunsten der dNTPs verhindert wird. Im Gegensatz dazu erleichtern die Mutationen wie K70R oder M41L die Freisetzung der bereits eingebauten NRTI.

#### **Nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTI)**

Anders als die NRTI hemmen die NNRTI nur die RT des HIV-1 und nicht die des HIV-2. Sie unterscheiden sich chemisch deutlich von den NRTI und binden in einer hydrophoben

Tasche der p66-Untereinheit der RT in der Nähe des aktiven Zentrums. Dadurch werden die Substratbindung und damit der Einbau der dNTPs sterisch behindert.

Bei der Resistenzentwicklung gegenüber den NNRTI stehen Veränderungen der hydrophoben Bindungstasche im Vordergrund mit einer charakteristischen niedrigen genetischen Barriere (De Clercq, 1998). Hierbei verringern Resistenzmutationen die Affinität von RT und NNRTI und führen so zu einem Wirkungsverlust.

### **Integraseinhibitoren**

Die bisher zugelassenen Integraseinhibitoren hemmen einen der vier Hauptschritte bei der Integration viraler DNA, den Strangtransfer, so dass das Andocken der Integrase sowie die irreversible Bindung der Hydroxylenden der viralen DNA an die Phosphodiesterbrücken der Wirts-DNA nicht möglich ist.

Der Strangtransfer trotz Anwesenheit von Inhibitoren wird durch Resistenzmutationen im katalytischen Zentrum der Integrase ermöglicht (Malet *et al.*, 2008).

### **Eintrittsinhibitoren**

Die Klasse der Eintrittsinhibitoren lässt sich in zwei Gruppen einteilen, wobei insgesamt nur zwei Medikamente bisher zugelassen sind. Beide Gruppen verhindern das Eindringen des Virus in die Zelle. Die Korezeptorantagonisten blockieren CCR5, einen der wichtigsten Korezeptoren bei der Bindung des Virus an die Zielzelle. Gegen den Korezeptorantagonisten gibt es zwei unterschiedliche Mechanismen der Resistenz. Das Virus kann einen Wechsel des bevorzugten Korezeptors von CCR5 zu CXCR4 vollziehen, so dass die Blockade des CCR5-Rezeptors folgenlos bleibt oder aber durch Mutationen die Eigenschaft erlangen, CCR5-Rezeptoren trotz des gebundenen Inhibitors nutzen zu können.

Der Fusionsinhibitor T20 ist ein Peptid, das an gp41 bindet und dadurch den weiteren Fusionsvorgang von Virus und Zelle blockiert. Resistenzmutationen in gp41 gegenüber dem Fusionsinhibitor führen zu einem Verlust der Affinität zwischen der Bindungsregion und dem Inhibitor, wobei Mutationen sowohl direkt in der Bindetasche als auch außerhalb beobachtet wurden (Mink *et al.*, 2005).

### **Proteaseinhibitoren (PI)**

Die Proteaseinhibitoren wirken gegen die Protease von HIV-1 und HIV-2. Wie bereits erwähnt, ist die Protease essentiell während der Reifung und damit auch für die Infektiosität der abgeschnürten Viruspartikel. Bei der Hemmung der Protease werden zwar weiterhin Viruspartikel gebildet, jedoch sind diese unreif, damit nicht infektiös und führen auch zu keiner messbaren Viruslast (Debouck, 1992). Dadurch wird die Infektion neuer Zellen verhindert und die Ausbreitung der Viren gestoppt. PI sind Moleküle, die mit den natürlichen

Substraten, den Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen, kompetitiv um das aktive Zentrum der Protease konkurrieren. Nach der reversiblen Bindung an das aktive Zentrum der viralen Protease, die sich strukturell von zellulären Proteasen unterscheidet, wird eine Konformationsänderung induziert, die zur Inaktivierung des Enzyms führt.

Zu den Proteaseinhibitoren zählen Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Amprenavir bzw. Fosamprenavir, Lopinavir, Darunavir, Tipranavir und Atazanavir. Ritonavir ist ein potenter Inhibitor des Isoenzym 3A4, einer Untereinheit des Cytochrom P450-Enzymsystems. Aufgrund dieser Eigenschaft können durch die Zugabe kleiner Dosen Ritonavir die Spiegel fast aller Proteaseinhibitoren deutlich gesteigert ("geboostert") werden (Kempf *et al.*, 1997).

PI-Resistenzmutationen beeinflussen die Bindung des Inhibitors an die Protease und führen auf diese Weise zu einem Verlust der Wirksamkeit der verabreichten Medikamente. Eine einzige Mutation reicht jedoch meistens nicht aus, um eine Unwirksamkeit der Medikamente zu bewirken, sondern es müssen verschiedene zusammenkommen (hohe genetische Barriere). Diese resistenzvermittelnden Mutationen in der Protease begünstigen zwar die Replikationsfähigkeit des Virus bei Medikamentenexposition können jedoch auch die spezifische und geordnete Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine an den Schnittstellen negativ beeinflussen, wobei die Replikationsdefekte der PI-resistenten Viren massiver auszufallen scheinen als die Defekte der RT-resistenten Viren (Berkhout, 1999). Insgesamt muss das Virus eine Gratwanderung zwischen einer Anpassung an die verabreichten Medikamente und dem Verbleib der biologischen Aktivität innerhalb des viralen Replikationszyklus vollziehen. Deswegen treten neben den direkt resistenzvermittelnden PR-Mutationen (primäre Mutationen) im Verlauf der Resistenzentwicklung ebenfalls kompensatorische (sekundäre) Mutationen auf, denen die Wiederherstellung der viralen Fitness zugesprochen wird. In einem Stufen-Modell der HIV-Resistenzentwicklung gleichen sekundäre, adaptive Veränderungen die mit Primärmutationen einhergehenden Fitnessprobleme wieder aus und ermöglichen es diesen Viren zum prädominanten Stamm im Patienten zu werden (Berkhout, 1999). Dementsprechend treten bei der Entstehung der PI-Resistenz häufig die Mutationen, die die Medikamentenwirksamkeit herabsetzen, und die kompensatorischen Mutationen, die die katalytische Aktivität der mutierten Protease verbessern, zusammen auf (Pillero, 2002).

Die Evolution der Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren zeigt ein komplexeres Bild als z.B. die der RT-Inhibitoren. Die Inhibition der Protease schafft eine Dreiecksbeziehung zwischen Enzym, Substrat und Inhibitor, wobei im Unterschied zu den anderen Inhibitoren zwei dieser drei Komponenten vom Virus stammen und somit beide auch durch die hohe Fehlerrate der reversen Transkriptase eine spezifische Anpassung erfahren können. Es

findet auch eine Selektion von Mutationen außerhalb der direkten Zielregion der Medikamente statt.

Die Entwicklung der PI-Resistenz läuft in mehreren Schritten ab, die unterschiedliche Veränderungen in der Interaktion Enzym-Substrat-Inhibitor bewirken. Die Kaskade fängt damit an, dass die Replikation der zunächst überwiegenden, voll funktionsfähigen Wildtyp-Viren unter dem Einfluss von Proteaseinhibitoren unterdrückt wird. In dieser Zeit werden diejenigen HIV-1-Quasispezies aus dem Virenreservoir des Patienten selektiert, die eine PI-resistente Protease aufweisen. Ihre Fitness ist zwar häufig reduziert, aber dennoch besser als die der Wildtyp-Viren unter dem Selektionsdruck des Proteaseinhibitors. Die eingeschränkte Spaltungseffizienz der resistenten Protease resultiert in einer verminderten Replikationskapazität. Als nächster Schritt in der Resistenzevolution wird die Reparatur der Enzymfunktion durch kompensatorische, adaptive Mutationen angenommen, die auch die Replikationsfähigkeit des Virus verbessern. Die Entstehung der sekundären Veränderungen wird durch die primären Mutationen ausgelöst und nicht durch den Proteaseinhibitor (Borman *et al.*, 1996). Sekundäre Mutationen treten nicht nur in der Protease auf, sondern auch außerhalb. Eine der Möglichkeiten für eine verbesserte Enzym-Substrat-Funktion bei der Virusreplikation ist die Modifikation der Schnittstellen bzw. der Anpassung des Substrats an die veränderte Situation (Berkhout, 1999). Solche Mutationen sind z.B. an zwei Schnittstellen, die das p1-Protein flankieren (p7/p1 und p1/p6-gag), an sehr unterschiedlichen Patientenkollektiven beobachtet worden (Doyon *et al.*, 1996; Kaufmann *et al.*, 2001). Auch *in vitro* stellen diese Mutationen, ähnlich den Sekundärmutationen in der Protease, die beeinträchtigte replikative Fitness des resistenten Virus wieder her (Prabu-Jeyabalan *et al.*, 2004). Neben diesem kompensatorischen Charakter der Schnittstellenmutationen konnte mittlerweile jedoch auch gezeigt werden, dass HIV-1 Gag-Schnittstellen direkt resistenzvermittelnd sein können. Diesem neu entdeckten Mechanismus der Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren liegt eine erhöhte Spaltungseffizienz der Gag-Vorläuferproteine zugrunde, die zu einer Präferenz des natürlichen Substrats gegenüber den Proteaseinhibitoren für die Bindung im aktiven Zentrum der viralen Protease führen (Nijhuis *et al.*, 2007b).

Als ein weiterer Mechanismus der Resistenz oder aber als eine kompensatorische Anpassung wird immer wieder auch eine Erhöhung der Frameshifffizienz in Betracht gezogen. Einen Einfluß darauf können Mutationen nehmen, die die Stabilität der Haarnadelstruktur erhöhen (Telenti *et al.*, 2002) oder aber zur Ausbildung einer zweiten slippery site führen (Doyon *et al.*, 1998). Eine erhöhte Frameshifffizienz bedingt einen Anstieg in der Konzentration der Gag-Pol-Vorläuferproteine und somit auch der viralen Enzyme. Da jedoch der Medikamentenspiegel der PR-, RT- oder Integraseinhibitoren innerhalb der Zellen gleich bleibt, könnte es zu einem Wirkungsverlust der Medikamente

kommen, die zur suffizienten Unterdrückung der viralen Replikation eine größere Anzahl von viralen Proteinen inhibieren müssten. Darüber hinaus ist bisher wenig über den Effekt von Mutationen in diesem Bereich bekannt, die aufgrund der Substratanpassung unter antiretroviraler Therapie selektiert werden und auch zu einer Veränderung des frameshiftregulierenden Bereichs führen (Gatanaga *et al.*, 2002).

### **Neuartige Therapieansätze**

RNA-basierte Gentherapie im Zusammenhang mit HIV-1 gehört zurzeit zu den alternativen Therapieansätzen (Berkhout, 2004). Eine der vielversprechendsten Methoden dabei ist die Nutzung der RNA-Interferenz durch siRNA (small interfering RNA). Diese post-transkriptionelle Inhibition der Genexpression gehört unter anderem zu den natürlichen Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen, wird heute jedoch auch als neuartiger Therapieansatz untersucht. Eine doppelsträngige siRNA bestehend aus 19-21 Nukleotiden wird in die Zelle eingeschleust und nach Abbau des sense-Stranges in den sogenannten RISC-Proteinkomplex integriert (RNA-induced silencing complex). Dieser bindet mit dem antisense-Strang an die Ziel-mRNA und führt zu deren Degradation, so dass keine Translation mehr stattfinden kann.

Im Rahmen einer Gentherapie ist die Verabreichung von siRNA aufgrund kurzer Halbwertszeiten nicht geeignet, jedoch besteht die Möglichkeit, siRNA als shRNA (short hairpin RNA) in einem Expressionsvektor in die Zellen einzuschleusen und dort transient zu exprimieren. Ziel der Forschung ist eine stabile Expression der si- bzw. shRNA im menschlichen Körper zur Bekämpfung der HI-Viren.

2002 wurde erstmals gezeigt, dass synthetische siRNA, unter anderem auch gegen Gag gerichtet, die Replikation der Viren *in vitro* inhibieren konnte (Novina *et al.*, 2002). Auch erste *in vivo* Versuche sind schon gemacht worden (Das *et al.*, 2004). Von entscheidender Bedeutung ist auch hier die Resistenzentwicklung zu sehen, die einer Monotherapie entgegensteht, so dass der Einsatz von siRNA gegen mehrere, hochkonservierte Zielbereiche gleichzeitig sinnvoll zu sein scheint.

### **1.6.3 Resistenzbestimmung**

Resistenz gegenüber antiretroviralen Medikamenten kann heute phänotypisch oder genotypisch untersucht werden.

In der phänotypischen Resistenztestung wird ein Resistenzfaktor gegenüber den verschiedenen Medikamenten in der Zellkultur bestimmt, indem die Bereiche der Protease und der reversen Transkriptase des zu testenden HI-Virus eines Patienten mit einem HIV-Labor-Referenzstamm rekombiniert werden. Dieser wird dann in der Zellkultur unterschiedlichen

Medikamenten in Verdünnungsreihen ausgesetzt, die notwendige spezifische Hemmkonzentration wird bestimmt und im Vergleich zum Referenzstamm als Resistenzfaktor (x-fache Resistenz) angegeben. Ein Vorteil dieser Art der Resistenzbestimmung ist, dass das System Aussagen über die gesamten Mutationen bezüglich der Medikamentenempfindlichkeit gibt. Es können auch Kreuzresistenzen und kompensatorische Effekte sowie neue bisher unbekannte Mutationen in ihrer Bedeutung erfasst werden, wobei die kompensatorischen Mutationen außerhalb der klonierten Region, z.B. in Gag, unberücksichtigt bleiben. Ein weiterer Nachteil der phänotypischen Resistenztestung liegt neben den hohen Kosten auch in der langen und sehr aufwendigen Art der Untersuchung sowie einer hohen Interassay-Varianz.

Die genotypische Resistenztestung beruht auf der Sequenzierung des HIV-Genombereichs, der für die Protease und reverse Transkriptase codiert, und anschließender Interpretation der Aminosäureaustausche. Es stehen verschiedene HIV-1 PR/RT-Resistenz-Bewertungssysteme zur Verfügung, die meisten basieren auf einer rules-based Expertenbewertung. Die Bewertung der einzelnen Mutationen stützt sich dabei maßgeblich auf Ergebnisse der Zellkulturrexperimente und zum kleineren Anteil auf klinische Fallbeispiele, z.B. das Versagen einer bestimmten Therapie mit dem Auftreten eines veränderten Genotyps. Interpretationssysteme wie geno2pheno basieren auf bioinformatischen Lernprogrammen, die phänotypische Resistenzwerte mit der entsprechenden Sequenz und darüber hinaus mit Daten therapie-naiver Viren durch Verfahren des maschinellen Lernens korrelieren. Dabei können einzelne Veränderungen nach ihrem Informationsgehalt für die Vorhersage eines bestimmten Phänotyps bewertet werden. Deshalb hat sich als routinemäßige Resistenzbestimmung bei HIV die genotypische Resistenztestung durchgesetzt, wobei der phänotypische Assay weiterhin die Grundlage für die Interpretation des genotypischen Resistenztests besonders bei neuen Medikamenten und veränderten Therapieregimen bleibt.

Bisher beschränkt sich die genotypische Resistenztestung routinemäßig auf die Veränderungen der reversen Transkriptase und der Protease sowie des gp41. Durch die Einführung neuer antiretroviraler Medikamente werden mittlerweile auch die Integrase sowie die V3-Region des gp120 untersucht. Im Zusammenhang mit PI-Resistenz könnte jedoch eine Betrachtung der Protease allein nicht ausreichend sein. Wie im Kapitel 1.6.1 beschrieben, kann eine Resistenzentwicklung gegenüber Proteaseinhibitoren sowohl im Enzym als auch im Substrat stattfinden. So rücken neben den bisher bekannten resistenzassoziierten Mutationen innerhalb des Zielproteins mehr und mehr Veränderungen außerhalb der PR in den Mittelpunkt des Interesses, die bisher sowohl bei der phänotypischen als auch bei der genotypischen Resistenzbestimmung unberücksichtigt bleiben. Besonders die Untersuchung der Schnittstellen der Protease steht im Vordergrund, da die Effizienz der Protease vor allem vom Substrat (Schnittstellen) abhängig ist (Berkhout,

1999). Veränderungen innerhalb zweier Proteaseschnittstellen werden bisher in Verbindung mit resistenz-assoziierten Mutationen der Protease als relevant angesehen, p7/p1 und p1/p6-gag. Die Bedeutung dieser Veränderungen für das Versagen einer PI-gestützten Therapie ist jedoch bisher nur zum Teil erforscht worden.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die systematische Untersuchung von Gag- und Pol-Schnittstellen (p7/p1, p1/p6-gag, p7/TFP und TFP/p6-pol) bei unterschiedlichen HIV-1 Subtypen unter Berücksichtigung der Therapiehistorie. Dazu sollen HIV-Isolate von therapie-naiven und therapie-erfahrenen Patienten mit einem virologischen Versagen aufgrund von Medikamentenresistenz analysiert werden.

Die Bedeutung von therapie-assoziierten Veränderungen als auch natürlichen Polymorphismen im frameshiftregulierenden Bereich soll anhand eines *in vitro* Frameshifffizienz-Assays untersucht werden.

Das Replikationsverhalten von HIV-1 mit Veränderungen, die sowohl die Enzym-Substrat-Interaktion als auch die Frameshifffizienz beeinflussen, soll in einer Replikationskinetik analysiert werden.

Anschließend soll die Möglichkeit einer Inhibition der Virusreplikation auf RNA-Ebene mittels siRNA in Abhängigkeit von den natürlichen Polymorphismen und therapie-assoziierten Mutationen in dem analysierten Bereich untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

- *Epicurian coli* **XL1** (Novagen-Merck, Darmstadt)  
*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*
- *Epicurian coli* **JM109** (Promega, Madison, USA)  
*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*

### 2.2 Eukaryotische Zellen

- C33A (ATCC: HTB-31): Adhärente, humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom mit epithelialer Morphologie (Auersperg, 1969).
- 293T: Adhärente, humane embryonale Nieren-Zelllinie mit einem zusätzlichen T-Antigen des Simianen Virus 40 (DuBridge *et al.*, 1987).
- CEMx174: Humane CD4-positive Suspensionszelllinie, hybridisiert aus der humanen B-Zelllinie 721-174 und der T-Lymphoblasten-Zelllinie CEM (Salter *et al.*, 1985).

### 2.3 Patientencharakteristika

Es wurden die Sequenzen von insgesamt 1409 Patienten untersucht. 1039 HIV-Sequenzen wurden dabei als HIV-1 Subtyp B klassifiziert. 370 Sequenzen, die anderen Subtypen zugeordnet werden konnten (A, C, D, F, G und andere rekombinante, zirkulierende Formen), wurden in der Gruppe non-B-Subtypen zusammengefasst. Alle Proben stammen aus den Jahren 2001-2007.

Die analysierten Sequenzen konnten außerdem in folgende Gruppierungen eingeteilt werden: therapie-naive ohne PR-Mutationen (TN, n=931), therapie-naive mit primären PR-Resistenzmutationen (n=23) oder Resistenzmutationen in der RT (n=68) sowie therapie-erfahrene (TE, n=387) mit mindestens einer der primären resistenz-assoziierten PR-Mutationen. Zu den primären Resistenzmutationen in der Protease wurden laut der IAS-Liste (International AIDS Society) folgende Mutationen gezählt - L24I, D30N, V32I, M46I/L, I47A/V, G48V, I50L/V, I54A/L/M/S/T/V, L76V, V82A/F/L/S/T, I84V, N88S, L90M. Die therapie-naiven Isolate mit resistenz-assoziierten RT-Mutationen wiesen mindestens eine dieser folgenden

RT-Mutationen auf (M41L, A62V, K65R, D67N, K70E/R, L74V, V75I, F77L, K103N, Q151M, Y181C/I, M184I/V, G190A/S, L210W, T215F/Y, K219E/Q).

Zusätzlich konnten 94 Isolate (Subtyp B) von HIV-infizierten Patienten retrospektiv untersucht werden, die in den Jahren 1987-1990, lange vor der Einführung von Proteaseinhibitoren in der antiretroviralen Therapie, in Form von Zellkulturüberständen archiviert wurden.

Bei der Frameshiftanalyse wurden außerdem drei Isolate von therapie-erfahrenen Patienten des Subtyps B mit Resistenzmutationen in der reversen Transkriptase untersucht.

## 2.4 Nukleinsäuren

### 2.4.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Oligonukleotide, die als Primer in PCR-Reaktionen und für Sequenzierungen verwendet wurden, wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert.

Alle Primer werden in der folgenden Tabelle in 5' ⇒ 3' Richtung angegeben. Die Positionen der Primer im HIV-1 Genom sind relativ zur Sequenz des Referenzstammes HxB2 angegeben (Tabelle 1).

PCR- und Sequenzierprimer		
Oligonukleotid	Sequenz 5' ⇒ 3'	Position innerhalb des HxB2 Genoms
p6-1	CCA ATT CCC CCT ATC ATT TTT GG	2404←2382
p6-2	GGC TGT TGG AAA TGT GGA AAG GA	2023→2045
LTR-A	CGA CGC AGG ACT CGG CTT GC	687→706
p6-3a	TCT TCT AAT ACT TGT ATC ATC TGC TC	2332←2356
LTR-4b	AAT AAA GCT TGC CTT GAG TGC TCC	527→550
gag-7	CTG CTA TGT CAC TTC CCC TTG G	1480←1501
gag-6	GAT GAC AGA AAC CTT GTT GGT CC	1737→1759
gag-2	GAG GTA AAA GAC ACC AAG GAA GC	1066→1088
gag-5	GGG GTG GCT CCT TCT GAT AAT G	1310←1331
gag-5r	CAT TAT CAG AAG GAG CCA CCC C	1310→1331
gag-4	GAA ATG ATG ACA GCA TGT CAG GG	1822→1844
gag-1	AAA ATT CCC TGG CCT CCC CTT G	2112←2133
2001s	TGC AGG GCC CCT AGR AAA ARG GGC TGT T	2001→2028
3532as	TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG GTC A	3532←3505
3454as	AGT GCT AGC TCT GCT TCT TYT GTT AGT GGT A	3454←3424

PCR- und Sequenzierprimer		
Oligonukleotid	Sequenz 5' ⇒ 3'	Position innerhalb des HxB2 Genoms
p6-4-fs-KpnI	GGG CTG TTG GTA CCT GGA AAG GAA GGA CAC CAA ATG A	2025→2059
p6-5-fs-BamHI	GGG CTG TTG GAT CCG GCT GTT GGC TCT GGT CTG CTC	2139←2170
pDual-Seq	GCG ACC CCG GCT TCT TCA GC	-

Primer für die <i>in vitro</i> Mutagenese	
Oligonukleotid	Sequenz 5' ⇒ 3'
A431V	AAA GAT TGT ACT GAG AGA CAG GTT AAT TTT TTA GGG AAG ATC TGG
449F (TTT)	CGA GCA GGG GGT ACC GAA TTT TTT TCA GAG CAG ACC AGG ATC CAA GAA GAC G
449F (TTC)	CGA GCA GGG GGT ACC GAA TTT TTT CCA GAG CAG ACC AGG ATC CAA GAA GAC G
449L (TTG)	CGA GCA GGG GGT ACC GAA TTT TTT GCA GAG CAG ACC AGG ATC CAA GAA GAC G

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotidsequenzen.**

#### 2.4.2 Synthetisch hergestellte Oligoribonukleotide

siRNA1: 5'-CUGAGAGACAGGCUAAUUU-3'

siRNA2: 5'-GGCCAGGGAAUUUUCUUCA-3'

siRNA3: 5'-CUGAGAGACAGGUAAUUU-3'

Alle drei siRNA wurden von der Firma Operon (Köln) hergestellt.

#### 2.4.3 Reporterplasmide

Die verwendeten Plasmide besitzen das  $\beta$ -Laktamasegen zur Selektion der plasmidhaltigen Bakterien mittels Ampicillin. Die Plasmide pDual-HIV(-1) und pDual-HIV(0) wurden von Leà Brakier-Gingras aus Kanada (Dulude *et al.*, 2006) und die Plasmide pNL4.3 und pNL4.3 $\Delta$ PRT5' von Claudia Kücherer aus Berlin freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Plasmide dienten als Basis für die Klonierung von HIV-1 Sequenzen aus dem beschriebenen Patientenmaterial.

- **pDual-HIV(-1)** enthält die HIV-1 p1-Frameshiftregion zwischen den reading frames der *Renilla* und *Firefly* Luciferase unter einem T7-Promoter. Die *Firefly* Luciferase ist

im reading frame um -1 verschoben, so dass sie nur dann translatiert wird, wenn ein HIV-1 bedingtes Frameshiftereignis stattfindet (Dulude *et al.*, 2006).

- **pDual-HIV(0)** enthält wie pDual-HIV(-1) die HIV-1 p1-Frameshiftregion, jedoch ist die slippery site sowohl mutiert als auch um eine Base erweitert, so dass der HIV-1 bedingte Frameshift nicht stattfinden kann und die *Firefly* Luciferase konstitutiv translatiert werden kann (Dulude *et al.*, 2006).
- **pNL4.3** Rekombinanter infektiöser pUC18-Vektor mit proviralem HIV-1-Genom (NL4.3), flankiert von genomischer DNA, Ampicillin Resistenz, Größe 14,879 kB (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program; HIV-Datenbank Acc. M19921).
- **pNL4.3ΔPRT5'** Auf pNL4.3 basierender pUC18-Vektor mit 1,2 kB-Deletion im *pol*-Gen des HIV-1-Provirus, Größe 13,442 kB (Walter *et al.*, 1999).
- **pBSSK<sup>+</sup>** Klonierungsvektor, hier als unspezifische Träger-DNA genutzt (pBluescript<sup>®</sup> II SK(+), Stratagene GmbH, Heidelberg)

#### 2.4.4 DNA-Längenstandards

- **100 bp DNA-Leiter** (Fermentas, St.Leon-Rot)  
Zur Größenbestimmung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente von 100 bp bis 1 kb

<i>Fragmentgrößen:</i>	100bp	600bp
	200bp	700bp
	300bp	800bp
	400bp	900bp
	500bp	1000bp

- **1 kb DNA-Leiter** (Fermentas, St.Leon-Rot)  
Zur Größenbestimmung doppelsträngiger Plasmidfragmente von 250 bp bis 10 kb

<i>Fragmentgrößen:</i>	250bp	1500bp	3500bp	8000bp
	500bp	2000bp	4000bp	10000bp
	750bp	2500bp	5000bp	
	1000bp	3000bp	6000bp	

## 2.5 Enzyme und Enzyminhibitoren

- RNase-Inhibitor Boehringer (Mannheim)
- T4 DNA-Ligase Fermentas (St.Leon-Rot)

- Restriktionsenzyme *KpnI*, *BamHI*, *Apal*,  
*NheI*, *XbaI*, *DpnI* Fermentas (St.Leon-Rot)
- Alkaline Phosphatase (CIP) New England BioLabs (Frankfurt a.M.)

## 2.6 Reagenzien

### 2.6.1 Reagenziensysteme

- QiaAmp Viral RNA Kit Qiagen (Hilden)
- One Step RT-PCR Kit Qiagen (Hilden)
- „Hot-Start“-PCR-Kit Qiagen (Hilden)
- QiaQuick PCR Purification Kit Qiagen (Hilden)
- QiaPrep<sup>®</sup> Spin Miniprepkit ISO Qiagen (Hilden)
- EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit Qiagen (Hilden)
- QuikChange<sup>™</sup> Mutagenesis Kit Stratagene (Heidelberg)
- *Taq* Dye Terminator Ready Reaction Mix,  
BigDye<sup>®</sup> Version 2.0 Applied Biosystems (Darmstadt)
- ViroSeq<sup>™</sup> HIV-1 Sequencing Module Abbott (Wiesbaden)
- Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System Promega (Madison, USA)
- HIV-1 p24-Antigen Assay (in house) Aalto Bio Reagents (Dublin, Irland)
- Tween<sup>®</sup> 20 Sigma (Taufkirchen)
- Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 Invitrogen (Karlsruhe)

### 2.6.2 Puffer und Lösungen

- **PBS** (Phosphate Buffered Saline)
 

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
- **TSB**

PEG (MW=3350)	30 mM
DMSO	5%
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

## MATERIAL

---

MgSO <sub>4</sub>	10 mM
<b>• TAE-Puffer</b>	
Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
<b>• 2x HBS</b>	
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1,5 mM
HEPES, pH 7,05	50 mM
<b>• 10x Farbmarker für Agarosegele</b>	
Glycerin	5 ml
Bromphenolblaulösung 5%	3 ml
Xylen-Cyanol-Lösung 5%	3 ml
TAE-Puffer 50x	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	1,3 ml

### 2.6.3 Sonstige Chemikalien

• Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
• Bromphenolblau	ServaFeinbiochemika (Heidelberg)
• CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma (Taufkirchen)
• DMSO	AppliChem (Darmstadt)
• Eisessig	Merck (Darmstadt)
• Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
• Ethanol 98%	Roth (Karlsruhe)
• Ethidiumbromidlösung 1µg/ml	ServaFeinbiochemika (Heidelberg)
• Fötale Kälberserum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
• 10x Genetic Analyzer Buffer (enthält EDTA)	Applied Biosystems (Darmstadt)
• Glycerin wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
• HEPES	AppliChem (Darmstadt)
• HCl	Roth (Karlsruhe)
• Isopropanol	Merck (Darmstadt)
• KCl	Merck (Darmstadt)

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  AppliChem (Darmstadt)
- L-Glutamin PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
- MilliQ Plus  $\text{H}_2\text{O}$  Fresenius Kabi (Darmstadt)
- $\text{MgCl}_2$ -Lösung 25mM Qiagen (Hilden)
- $\text{MgSO}_4$  Merck (Darmstadt)
- NaCl Roth (Karlsruhe)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Merck (Darmstadt)
- PEG (MW=3350) Sigma (Taufkirchen)
- Performance-Optimized-Polymer (POP)-6 Applied Biosystems (Darmstadt)
- Performance-Optimized-Polymer (POP)-7 Applied Biosystems (Darmstadt)
- 10x PCR Puffer (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8,3) Qiagen (Hilden)
- Penicillin-Streptomycin Invitrogen (Karlsruhe)
- Reinstwasser Merck (Darmstadt)
- RNase freies  $\text{H}_2\text{O}$  Merck (Darmstadt)
- Sephadex™ G-50 superfine Amersham Pharmacia (Freiburg)
- SeaKem®LE Agarose BMA (Rockland)
- SuperFekt Transfection Reagent Qiagen GmbH (Hilden)
- Tris Roth (Karlsruhe)
- Trypsin/EDTA Invitrogen (Karlsruhe)
- Xylen-Cyanol Sigma (Taufkirchen)

## 2.7 Medien

### Medien für die Bakterienkultivierung

- **LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, pH 7,2)** AppliChem (Darmstadt)
 

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Zusatz von Ampicillin:	100 µg/ml
- **LB-Agar:** AppliChem (Darmstadt)
 

LB-Medium (s.o.)	
Bacto-Agar	15g/l

### Medien für die Zellkultivierung

- **Dulbecco's MEM** ("Modified Eagle Medium") (Invitrogen, Karlsruhe)  
 Mit Glutamax, ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glucose, mit Pyridoxin Zusatz von:

- |  |             |                         |
|--|-------------|-------------------------|
| Fötale Kälberserum (FBS)   | 10 %        |                         |
| Streptomycinsulfat   | 150 mg/l    |                         |
| Penicillin   | 150 000 U/l |                         |
| • <b>DPBS 1x</b>   |             | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| • <b>RPMI-1640 Vollmedium</b> (Rosewell Park Memorial Institute) |             | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| Zusatz von:  |             |                         |
| Fötale Kälberserum (FBS)   | 10 %        |                         |
| L-Glutamin   | 200 mM      |                         |
| • <b>Opti-MEM®</b> (Reduced-Serum Medium)                        |             | (Invitrogen, Karlsruhe) |

## 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

### **Zentrifugen:**

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| • Tischzentrifuge Centrifuge 5417C/15575 | Eppendorf (Hamburg)         |
| • Laborzentrifuge 2K 15                  | Sigma (Taufkirchen)         |
| • Plattenzentrifuge                      | Sigma (Taufkirchen)         |
| • Sorvall RC50                           | Heraeus Instruments (Hanau) |

### **Elektrophorese-Geräte:**

- |                                       |                  |
|---------------------------------------|------------------|
| • Elektrophorese Power PAC (Netzteil) | BioRAD (München) |
| • Gelelektrophoresekammer Sub-Cell GT | BioRAD (München) |
| • Geldokumentationsanlage 75S/03646   | BioRAD (München) |

### **Sonstige Geräte:**

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| • ABI 310 Genetic Analyzer                 | Applied Biosystems (Darmstadt) |
| • ABI 3130xl Genetic Analyzer              | Applied Biosystems (Darmstadt) |
| • Begasungsbrutschrank                     | Heraeus Instruments (Hanau)    |
| • ELISA-Reader infinite 2000               | Tecan (Männedorf, Schweiz)     |
| • ELISA-Washer Columbus Pro                | Tecan (Männedorf, Schweiz)     |
| • (Schüttel-)Inkubator, 37°C               | NBS (Nürtingen)                |
| • Lichtmikroskop                           | Zeiss (Oberkochen)             |
| • Magnetrührer IKAMAG                      | IKA Labortechnik (Staufen)     |
| • MultiScreen Column Loader                | Millipore (Eschborn)           |
| • MultiScreen 96 Mikrotiterplatte MAHK-N45 | Millipore (Eschborn)           |

- NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer peqlab-Biotechnologie (Erlangen)
- PCR-Thermoblock TRIO Biometra (Göttingen)
- pH-Meter 538 WTW (Weilheim)
- Reinstwasseranlage Milli-QPlusPF Millipore (Eschborn)
- Smart Spec 3000 Spectrophotometer BioRAD (München)
- Sterilbank Clean Air CA/REV4 Clean Air Technik (Woerden)
- Thermomixer compact 535002222 Eppendorf (Hamburg)
- UV-VIS-Spektrometer BioRAD (München)
- Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter Perkin Elmer (Waltham, USA)
- Wasserstrahlpumpe IKA Labortechnik (Staufen)

Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff und Glas wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhäuser), Sarstedt (Nümbrecht), Applied Biosystems (Darmstadt) und Neolab (Heidelberg) bezogen.

## 2.9 Software zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten

- Sequence Analysis Version 3.2 Applied Biosystems (Darmstadt)
- DNASTAR Lasergene GATC GmbH (Konstanz)
- ClustalX EMBL-Heidelberg (Heidelberg)
- RNAfold Vienna package (frei verfügbar)
- Excel Microsoft Office

## 2.10 Hilfsmittel im Internet

- ExPASy molecular biology server [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)
- geno2pheno [www.geno2pheno.org](http://www.geno2pheno.org)
- QuickAlign [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)
- Exakter Test nach Fisher [faculty.vassar.edu/lowry/tab2x2.html](http://faculty.vassar.edu/lowry/tab2x2.html)
- Primerdesign [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)
- Literaturrecherche [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- siRNA Design [www.dharmacon.com/DesignCenter](http://www.dharmacon.com/DesignCenter)

## 2.11 Datenbanken

- ROSIE interne HIV-Datenbank
- Arevir Database interne HIV-Datenbank

## **3 Methoden**

### **3.1 DNA-Methoden**

#### **3.1.1 Isolierung viraler RNA**

##### **Abtrennung der Zellbestandteile von EDTA-Blut**

Um die Zellbestandteile des Bluts vom Plasma abzutrennen, wurde die Blutprobe bei 3000 g zehn Minuten zentrifugiert, so dass die zelluläre Fraktion am Boden des Probenröhrchens sedimentierte. Die zellfreie Plasmafraktion, die sich als Überstand bildete, wurde abgenommen und bei  $-80^{\circ}$  C gelagert.

##### **Prinzip der HIV-RNA-Isolierung**

Bei Plasma aus EDTA-Blut wurde der QiaAmp Viral RNA Kit von Qiagen verwendet. Unter denaturierenden Bedingungen wurde die virale RNA in der Probe freigesetzt und unter geeigneten Pufferbedingungen reversibel an eine Silikamatrix gebunden. Nach mehrfachem Waschen wurde die RNA durch einen Puffer mit geringerer Ionenstärke von der Matrix eluiert.

##### **Isolierung viraler RNA aus EDTA-Blut HIV-infizierter Patienten**

Nach der Abtrennung der Zellbestandteile, wie oben beschrieben, wurden 280  $\mu$ l des Plasmas mit 1120  $\mu$ l hochdenaturierendem AVL-Lysispuffer und 10  $\mu$ l Carrier-RNA versetzt. Durch den Lysispuffer, der chaotrope Salze enthält, wurden alle vorhandenen Virusstrukturen (Kapsid und Hülle) denaturiert. Durch Zugabe der Carrier-RNA wurde das Lösungsgleichgewicht positiv beeinflusst, so dass auch geringe Mengen viraler RNA gefällt werden konnten. Außerdem wurde dadurch die mögliche Degradation der viralen RNA durch eventuell vorhandene RNasen begrenzt. Die Extraktion geringster Mengen RNA aus einer Probe wurde so ermöglicht. Durch Zugabe von 1120  $\mu$ l Ethanol (96-100%ig) nach einer zehnminütigen Inkubation im Lysispuffer wurde die Nukleinsäure gefällt, blieb aber in einer kolloidalen Lösung erhalten und konnte nach Mischen auf die QiaAmp-Silikasäule aufgetragen werden. Durch einminütige Zentrifugation bei 6000 g wurde die RNA an die Matrix gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die gesamte Probe durch den Filter gelaufen war.

Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt und mit 500  $\mu$ l Waschpuffer AW1 eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Es wurde ein zweiter Waschschrift mit 500  $\mu$ l Waschpuffer

AW2 durchgeführt. Dies geschah mittels erneuter Zentrifugation bei 20000 g für 3 Minuten. Im nächsten Schritt wurde die RNA von der Säule eluiert, indem die Säule zunächst auf ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 50 µl AVE-Elutionspuffer mittig auf die Säule pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation bei 6000 g für eine Minute die virale RNA gewonnen. Durch Vorlage von 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl DTT in das Eppendorfreaktionsgefäß wurde die Möglichkeit einer RNase-Degradation minimiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.1.2 Reverse Transkription

Während der reversen Transkription (RT) wird zunächst die einzelsträngige HIV-RNA in doppelsträngige DNA, so genannte „complementary“ DNA (cDNA) transkribiert. Die RT wird bei geeigneten Pufferbedingungen, unter Zugabe von 10 mM freien Nukleotiden, entsprechenden Primern und einer retroviralen RNA-abhängigen DNA Polymerase durchgeführt. Im ersten Schritt entsteht ein RNA-DNA-Hybrid, dessen RNA-Anteil durch die RNaseH, die einen Teil der reversen Transkriptase bildet, unvollständig abgebaut wird. Die so entstehenden freien 3'-OH Enden der DNA dienen der reversen Transkriptase als Ausgangspunkt für die Synthese eines zweiten komplementären Strangs.

### 3.1.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen, die durch Bindung zweier Oligonukleotide an eine DNA-Matrize begrenzt wird (Mullis *et al.*, 1987). Die beiden, zu einem Bereich der DNA-Matrize komplementären, Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie den zu amplifizierenden Bereich flankieren und jeweils in 5' ⇒ 3' Richtung an einen der beiden vorher getrennten DNA-Stränge binden. Die Oligonukleotide dienen einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Primer für eine anschließende Synthesereaktion. Als DNA-abhängige DNA-Polymerase wird eine thermostabile Polymerase verwendet, z.B. aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*. Die *Taq*-Polymerase hat den Vorteil, dass es bei der sich zyklisch wiederholenden Denaturierungstemperatur nicht zur Inaktivierung des Enzyms kommt. So wird eine exponentielle Vervielfältigung der Zielregion erreicht.

Ein Zyklus wird in drei Schritte unterteilt:

1. Denaturierung der als Matrize dienenden DNA-Doppelstrangregion durch Erhitzen auf 95°C,

2. Hybridisierung der Oligonukleotide an die Komplementärregion der einzelsträngigen DNA-Vorlage (annealing),
3. Neusynthese eines komplementären Gegenstrangs durch die Polymerase (Elongation).

Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang getrennt. Im zweiten Schritt binden die Oligonukleotide an die komplementäre Region der beiden getrennten DNA-Stränge. Um ein möglichst spezifisches Produkt zu erhalten, ist es wichtig, dass die Primer eine Länge von 15 bis 30 Basen haben, um die Stellen im Genom ausreichend zu definieren. Bei der Konstruktion dieser Oligonukleotide muss darauf geachtet werden, dass sie nicht spezifisch an eine andere Region außerhalb der Zielregion der eingesetzten DNA binden können. Die Anlagerungstemperatur und Dauer dieses Schritts wird empirisch so ermittelt, dass nur ein spezifisches Produkt entstehen kann. Für die Ermittlung einer optimalen Annealingtemperatur wird die folgende Formel von Wu *et al.* verwendet (Wu *et al.*, 1991):

$$\text{Anlagerungstemperatur in } ^\circ\text{C} = 22 + 1,46 \times [2 \times (\text{Anzahl an G oder C}) + (\text{Anzahl A oder T})]$$

Im dritten Schritt der PCR kommt es zur Extension der Oligonukleotide durch eine DNA abhängige DNA-Polymerase. Die Temperatur ist hierbei von dem Temperaturoptimum des Enzyms abhängig und die Dauer von der Länge des zu amplifizierenden Produkts. Die Polymerase kann 60 Basen pro Sekunde an den vorhandenen DNA-Strang anknüpfen. Dieses Grundmuster einer PCR kann auf unterschiedliche Weise variiert werden, um eine bessere Spezifität des Produkts und höhere Sensitivität bezüglich der Erfassung niedriger Viruslasten zu erzielen.

#### a) „One Step“ RT-PCR

Bei der „One Step“ RT-PCR werden reverse Transkription und PCR in einer Reaktion zusammengefasst. Es wird ein Enzymgemisch aus einer reversen Transkriptase und einer „Hot start“ Polymerase eingesetzt. Der Vorteil einer solchen kombinierten Methode ist, dass es nicht so leicht zu Kontaminationen wie in zwei getrennten Reaktionen kommen kann. Nachteilig ist, dass beide Enzyme im gleichen Puffersystem arbeiten müssen, da die reverse Transkriptase und die DNA-Polymerase unterschiedliche Pufferbedingungen erfordern. Zunächst wurde die RNA bei einer Temperatur, die von der verwendeten RT (zwischen 37° und 50°C) abhängig ist, in cDNA transkribiert. Im zweiten Schritt wurde die DNA-Polymerase aktiviert. Sie lag zunächst als inaktive Vorstufe vor und musste durch eine initiale Hitzedenaturierung aktiviert werden. Dies bewirkte gleichzeitig eine Inaktivierung der reversen Transkriptase. Danach wurde ein „Touch down“ eingeführt. Bei diesem Schritt wurde die Hybridisierungstemperatur für die Oligonukleotide in den ersten Zyklen der

Kettenreaktion von etwa 2°C über der tatsächlichen Schmelztemperatur des Primer-Matrizen-Hybrids zu einer Temperatur von etwa 1°C unterhalb dieses Wertes mit einem Temperaturinkrement von -1°C pro Zyklus verringert. Anschließend folgte eine weitere Amplifikationsrunde mit 45 Zyklen mit einer annealing Temperatur von etwa 1°C unterhalb der tatsächlichen Schmelztemperatur. Dabei hätten zwar theoretisch unspezifische Nebenprodukte entstehen können, jedoch wurden bevorzugt Produkte aus den vorhergehenden erfolgreichen Zyklen gebildet, da diese den größeren Anteil der Matrizen zu dem Zeitpunkt ausmachten. Ohne die exakte Hybridisierungstemperatur zu kennen, entstanden so spezifische PCR-Produkte ohne störende Nebenprodukte. Die Ausbeute an Amplifikaten wurde dadurch ebenfalls erhöht.

**„One Step“ RT-PCR-Standardansatz:**

		Endkonz.:
5x „One Step“ RT-PCR-Puffer	10 µl	1x
dNTP-Lösung (je 10 mM)	2 µl	0,4 mM
RT-PCR Enzym-Mix	2 µl	
RNase-Inhibitor 10 U/µl	1 µl	10 U
fw Primer 100 µM	0,3 µl	0,6 µM
rev Primer 100 µM	0,3 µl	0,6 µM
Q-Solution	10 µl	
RNA-Matrize	5 µl	
RNase freies Wasser	ad 50 µl	

**Bedingungen für die „One step“ RT-PCR:**

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min	
Denaturieren des DNA-Doppelstrangs	95°C	30 sec	} x 3 (-1°C)
Anlagerung der Oligonukleotide	65°C	45 sec	
Extension der Oligonukleotide	72°C	3 min	
Denaturieren des DNA-Doppelstrangs	95°C	30 sec	} x 45
Anlagerung der Oligonukleotide	62°C	45 sec	
Extension der Oligonukleotide	72°C	3 min	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72°C	10 min	

**b) „Hot start“ PCR**

In der „Hot start“ PCR wurde eine zunächst inaktive *Taq*-Polymerase verwendet. Dies verhindert, dass sich nach Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz schon vor der

eigentlichen PCR unspezifische Produkte bilden konnten. Dies kann durch Extension von Primerdimeren und unspezifischer Bindung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize vor dem ersten Denaturierungsschritt geschehen. Die Inaktivierung der Polymerase wurde durch Bindung eines thermolabilen Antikörpers oder eine chemische Modifikation erzielt. Aktiviert wurde die „Hot start“ *Taq*-Polymerase durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten. Durch diesen Denaturierungsschritt wird entweder der thermolabile Antikörper denaturiert oder die chemische Modifikation abgespalten.

**„Hot start“ PCR-Standardansatz:**

		Endkonz.:
10x Puffer	5 µl	1x
dNTP-Lösung (je 10 mM)	2 µl	0,4 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	
fw Primer 100 µM	0,15-0,3 µl	0,3-0,6 µM
rev Primer 100 µM	0,15-0,3 µl	0,3-0,6 µM
Q-Solution	10 µl	
DNA-Matrize	1,5-5 µl	
Ampuwa-Wasser	ad 50 µl	

**Bedingungen für die „Hot start“ PCR:**

Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min	} x 39
Denaturieren des DNA-Doppelstrangs	95°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	62°C	45 sec	
Extension der Oligonukleotide	72°C	3 min	
Zusätzliche Extension der Oligonukleotide	72°C	10 min	

**c) semi-nested PCR**

Diese PCR-Methode zeichnet sich durch einen sequentiellen Aufbau von zwei Amplifikationsrunden mit insgesamt drei Primern aus, womit erhöhte Spezifität sowie Effizienz der DNA-Amplifikation erzielt wird. Nach der ersten PCR mit sogenannten „äußeren“ Primern wird das Produkt erneut in eine PCR-Reaktion gegeben, bei der einer der beiden ersten Primer mit einem weiteren, sogenannten „inneren“ Primer kombiniert wird. Dabei entsteht ein etwas kürzeres DNA-Fragment.

### 3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäuren verschiedener Länge aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität im elektrischen Feld voneinander trennen. Diese Mobilität ist abhängig von dem Molekulargewicht, der Konformation der Nukleinsäure, aber auch von der angelegten elektrischen Spannung, von der Temperatur, den Pufferbedingungen und der Konzentration der Agarose (Maniatis *et al.*, 1982).

Die aus der PCR gewonnenen Amplifikate wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese dargestellt. Durch gleichzeitiges Auftrennen eines definierten Längenstandards konnte die Fragmentgröße des amplifizierten Produkts ermittelt werden, da ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Fragmentgröße besteht. Die Konzentration des Agarosegels richtete sich nach der Größe des Fragments. Hier wurde meist ein 1%iges Agarosegel verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurde ein Gewichtsprozent des TAE-Puffers an Agarose eingewogen und zu dem Puffer gegeben. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgekocht. Das flüssige Gel wurde anschließend bis auf eine Temperatur von ca. 50°C abgekühlt und in eine für diesen Zweck präparierte Gelkammer gegossen. Diese Gelkammer wurde vorher mit Klebeband abgedichtet und mit einem Kamm, der eine bestimmte Anzahl an Taschen besitzt, versehen. Nach der Polymerisierung des Gels wurde es in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde langsam aus dem Gel gezogen und in die entstandenen Taschen wurden die Proben pipettiert. Dabei wurden 5 µl der einzelnen PCR-Ansätze zunächst mit jeweils 1 µl Ladepuffer versetzt, um die Probe zu beschweren und zu verhindern, dass das Produkt nach oben aus den Taschen diffundieren konnte. Auch 5 µl des Längenstandards wurden in eine Geltasche pipettiert. Die Spannung in der Gelelektrophoresekammer wurde so eingestellt, dass sie  $6-10 \frac{V}{cm \text{ Laufstrecke}}$  betrug. Nach ca. 35 Minuten war eine ausreichende Auftrennung erreicht. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) angefärbt. Unter kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda=250-310\text{nm}$ ) wurde die DNA mit eingelagertem Ethidiumbromid mittels einer Bilddokumentationsanlage fotografiert.

### 3.1.5 Quantifizierung der DNA

Da die Konzentration der DNA zunächst nur ungefähr bestimmt werden musste, wurde mit Hilfe eines im Ethidiumbromidbad gefärbten Agarosegels die aufgetragene Menge DNA mit einem Standard verglichen. Dazu wurde die Probe neben einem Standard mit definierter Länge und Menge DNA im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, gefärbt und unter UV-

Licht fotografiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Bande der Probe mit der entsprechenden Bande des Längenstandards, ließ sich die DNA-Konzentration annähernd abschätzen.

### 3.1.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR befinden sich neben dem spezifischen PCR-Produkt, das durch die Gelelektrophorese nachgewiesen wird, unspezifische Produkte wie z.B. Primerdimere oder überschüssige Nukleotide im Reaktionsansatz. Da sich diese Primerdimere und Nukleotide störend auf die folgenden Reaktionen auswirken können, wurden sie mittels QiaQuick® PCR Purification Kit von Qiagen entfernt.

Das Prinzip der Aufreinigung ist ähnlich dem der RNA-Isolierung, auch hier werden kleine Säulen mit Silikamatrix eingesetzt, an die die Nukleinsäuren reversibel binden. Voraussetzung für die Veränderung der Löslichkeitseigenschaften der Nukleinsäuren ist die hohe Konzentration von NaCl in dem zugegebenen Bindepuffer. Die Struktur des Lösungsmittels Wasser wird damit beeinflusst (Hamaguchi *et al.*, 1962; Vogelstein *et al.*, 1979). Außerdem dient die Matrix dazu, Oligonukleotide, die eine Länge von weniger als 40 Nukleotiden besitzen, zu entfernen. Aufgrund eines geänderten pH-Werts dieser kurzen Fragmente wird die pH-abhängige Bindung dieser Nukleinsäurefragmente unterbunden.

#### **Aufreinigung mit dem QiaQuick® PCR Purification Kit**

Der aufzureinigende PCR-Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen Bindepuffer PB in einem QiaQuick-Zentrifugensäulchen gut durchmischt. Nachdem die DNA unter diesen Pufferbedingungen an die Silikagelmatrix gebunden hat, wurde der Puffer bei 1 min Zentrifugation mit 10.000 g bei Raumtemperatur durch die Säule in ein 2 ml Sammelgefäß abzentrifugiert und verworfen. Durch Zugabe von 750 µl PE Waschpuffer auf die Säule und erneute Zentrifugation wurden Salze und andere Verunreinigungen aus der Silikagelmatrix ausgewaschen. Der Waschpuffer wurde anschließend verworfen. Eine anschließende Zentrifugation der Säule bei 10.000 g, 1 min, Raumtemperatur, entfernte letzte Spuren des im Waschpuffer enthaltenen Ethanol. Das Säulchen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, in dem im nachfolgenden Schritt das Eluat aufgefangen wurde. Um die DNA zu eluieren, wurde ein gewünschtes Volumen Reinstwasser mittig auf die QiaQuick-Matrix pipettiert. Die DNA wurde nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch erneutes Zentrifugieren (10.000 g, 1 min, Raumtemperatur) eluiert.

### 3.1.7 Sequenzreaktion

#### **Sanger-Methode der DNA Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode durch den Einbau von Didesoxynukleotiden. In der Sequenzreaktion werden dem Reaktionsgemisch neben den regulären dNTPs, die zur Extension der Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase benötigt werden, zusätzlich in einem gewissen Prozentsatz (ca. 6%) 2', 3'-Didesoxynukleotide zugegeben. Da diese Didesoxynukleotide an der 3'-Position keine Hydroxygruppe besitzen, kommt es nach ihrem Einbau in den neusynthetisierten Strang an dieser Stelle zum Kettenabbruch. Es werden vier Reaktionsgemische parallel angesetzt. Jedem der Ansätze wird neben den dNTPs jeweils eine Didesoxyvariante (entweder ddTTP, ddGTP, ddCTP oder ddATP) hinzugefügt. Die Mischung von dNTPs und ddNTPs wird so gewählt, dass es statistisch gesehen an jeder Stelle einmal zum Einbau eines ddNTPs und damit zu Kettenabbruch kommt. Während der Sequenzreaktion entstehen so verschieden lange Fragmente, die immer am 3' Ende das dem Ansatz zugesetzte Didesoxynukleotid aufweisen. Trennt man in einem denaturierenden Acrylamidgel die Sequenzprodukte der Größe nach durch Elektrophorese auf, kann man aufgrund der Laufstrecke die Position des dem Ansatz zugesetzten Didesoxynukleotids erkennen. Lässt man die Ansätze mit den unterschiedlichen Didesoxynukleotiden nebeneinander in einem Gel laufen, kann durch Laufstreckenvergleich ein direkter Schluss auf die Nukleotidabfolge in der Sequenz gezogen werden (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzprodukte können durch Radioaktivität oder Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

#### **Sequenzreaktion und Markierung der Produkte mit dem *Taq* Dye Terminator Ready Reaction Mix, BigDye® Version 2.0**

Hier wurde eine Modifikation der Sanger-Grundtechnik durchgeführt. Verwendet wurde das *Taq* Dye Terminator Ready Reaction Mix, BigDye® Version 2.0 (Applied Biosystems) bzw. ViroSeq™ HIV-1 Sequencing Module der Firma Abbott.

Diese Kits enthält einen fertigen Sequenzansatz mit Reaktionspuffer, DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid und dNTPs mit einem bestimmten Prozentsatz BigDyes™, das Kit ViroSeq™ enthält außerdem 7 verschiedene Sequenzierprimer für die pol-Region im jeweiligen Mix. BigDyes™ sind mit Fluoreszenzfarbstoffen modifizierte Didesoxynukleotide. Jedes der vier unterschiedlichen Didesoxynukleotide ist mit einer anderen Farbe markiert und so ist es möglich die Reaktion statt in vier getrennten Ansätzen in einem Reaktionsansatz durchzuführen. Bei der Sequenzreaktion entstehen, je nach Zeitpunkt des Kettenabbruchs und Art des zuletzt eingebauten ddNTPs, verschieden lange und unterschiedlich markierte DNA-Fragmente. Es wird eine mutierte und in *E. coli* exprimierte *Taq*-Polymerase verwendet, die die mehrfache Wiederholung der Sequenzreaktion und damit die Verwendung geringerer

Templatemengen erlaubt. Die  $\Delta 5'-3'$  Exonuklease Deletion und die Mutation T558G der Polymerase ermöglichen größere Leseweiten und einen verbesserten Einbau der fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Die endständig markierten DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe des ABI 310™ Genetic Analyzer oder des ABI 3130xl™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) der Größe nach auftrennen. Das zuletzt eingebaute Nukleotid kann aufgrund der Modifikation von den anderen Nukleotiden unterschieden werden.

**Der Ansatz für die Sequenzreaktion setzte sich wie folgt zusammen:**

**gag-Region:**

		gesamt:
PCR-Produkt	2 µl	60-130 ng
(bzw. Plasmid-DNA	2 µl	300-500 ng)
Primer (forward bzw. reverse)		0,6 µM
“Terminator Ready Reaction Mix”	2 µl	

**pol-Region:**

		gesamt:
PCR-Produkt	2 µl	60-130 ng
(bzw. Plasmid-DNA	2 µl	300-500 ng)
ViroSeq™ Mix		
mit den Primern (A, B, C, D, F, G oder H)	3 µl	

**Die Sequenzreaktion wurde in einem PCR-Thermoblock unter folgenden Bedingungen durchgeführt:**

Denaturierung der DNA Matrize	96°C	10 sec	} x 29
Denaturierung der DNA Matrize	96°C	10 sec	
Primeranlagerung und			
Extension der Oligonukleotide	60°C	3 min	

**3.1.8 Aufreinigung der Sequenzprodukte**

Nach der Sequenzreaktion liegen neben den fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten noch uneingebaute Didesoxynukleotide, Salze und weitere Bestandteile mit störendem Einfluss auf die Sequenzierung im Reaktionsgemisch vor. Vor allem die überschüssigen Didesoxynukleotide können die Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe des Kapillarsequenzers ABI 310™ Genetic Analyzer oder des ABI 3130xl™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) stören, da sie sich während des Sequenziervorgangs zu größeren Aggregaten zusammenlagern können. Die Folge wäre eine Überlagerung der Elektropherogramme und eine un-

leserliche Nukleotidsequenz. Die Aufreinigung der Sequenzprodukte erfolgt über Sepharosesäulen. Diese Aufreinigungsmethode beruht auf dem Prinzip der Gelfiltration. Das chromatographische Verfahren der Gelfiltration trennt Moleküle aufgrund ihres unterschiedlichen Stoke'schen Radius, einfach ausgedrückt, aufgrund der Molekularmassen. Die Sequenzprodukte wurden auf eine vorgequollene Gelmatrix aus Sepharose aufgetragen. Während die freien Didesoxynukleotide in der Lage sind, in das Innere der Gelpartikel zu diffundieren und dort festgehalten werden, werden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente von diesem molekularen Sieb ausgeschlossen und erscheinen im Eluat.

### **Durchführung**

Sephadex TMG-50 superfine-Pulver wurde in die Vertiefungen eines Multiscreen Column Loader gefüllt und überschüssiges Pulver entfernt. Eine MultiScreen96-Platte mit permeabler Membran wurde aufgesetzt und durch Umdrehen der Konstruktion fiel das Pulver in die Vertiefungen der zu befüllenden Platte. Jede Vertiefung wurde mit 300 µl Reinstwasser aufgefüllt und die Platte dann 3 Stunden bei 4°C quellen gelassen. Anschließend wurde die Platte in der Plattenzentrifuge 5 min bei 910 g abzentrifugiert. Auf das entstandene Gelbett wurde der mit 10 µl Reinstwasser versetzte Sequenzansatz gegeben. Die Platte wurde ein zweites Mal 5 min bei 910 g in der Plattenzentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss wurde aufgefangen. Die aufgereinigten Produkte der Sequenzreaktion wurden in spezielle Probengefäße überführt und mit einem Septum verschlossen.

### **3.1.9 Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ 310 und 3130xl Genetic Analyzer**

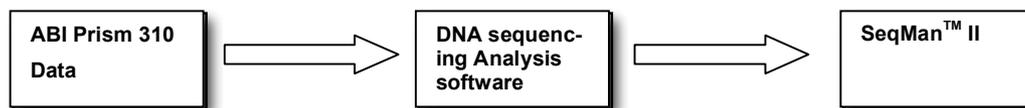
Mit Hilfe des ABI 310™ Genetic Analyzer oder des ABI 3130xl™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurden die in der Sequenzreaktion entstandenen 3'-fluoreszenzmarkierten DNA-Extensionsprodukte elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt. Für die Sequenzierung wurde das Sequenzprodukt (gelöst in Wasser) in spezielle Probengefäße überführt, die mit einem Septum verschlossen wurden, das die spätere Injektion der Kathode und Kapillare ermöglicht. Die Auftrennung erfolgte mittels Kapillarelektrophorese in einer Glasfaserkapillare, die mit Polymer gefüllt war. Nach Anlegen einer Injektionsspannung von 2 kV im Probengefäß sammelten sich die DNA-Extensionsprodukte an der Kathodenseite der Kapillare. Anschließend kam es in der Kapillare zu einer Auftrennung der Sequenzprodukte nach Größe. Am anodennahen Ende der Kapillare durchliefen die aufgetrennten Sequenzprodukte einer Probe ein Detektionsfenster, durch das die fluoreszenzmarkierten Fragmente von einem Argonlaser angeregt wurden. Sie emittierten eine Fluoreszenz, die mit Hilfe eines CCD-Chips detektiert werden konnte.

**Die folgenden Einstellungen wurden am Sequenzer vorgenommen:**

Injektionszeit:	10-15 sec, je nach Fragmentgröße
Injektionsspannung:	2 kV
Laufspannung:	15 kV
Lauftemperatur:	50°C
Laufzeit:	35-50 min, je nach Fragmentgröße

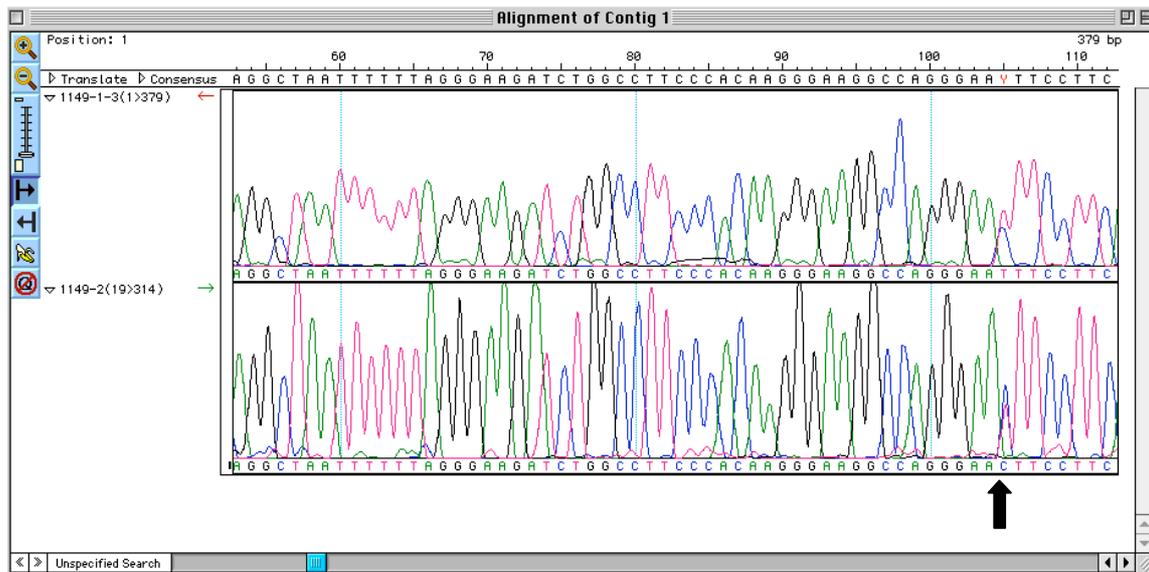
**3.1.10 Methoden zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten**

Zur Auswertung der Sequenzdaten werden Softwareprogramme der Firma Applied Biosystems und DNA STAR verwendet. Dieses System besteht aus unterschiedlichen Softwareanwendungen, die nacheinander genutzt werden.



Die entstandene Sequenz wurde manuell editiert. Dabei wurden die einzelnen Peaks auf Heterozygotien überprüft (Abbildung 9). Die Sequenz wurde als Textdatei im Fasta-format gespeichert.

Mit dem Internet-Tool „ExpASY“ wurden die Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen, sowohl im Gag- als auch im Pol-Leseraster, übersetzt. Die Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalX miteinander und mit der Aminosäuresequenz vom Referenzstamm HxB2 verglichen. Die Substitutionen wurden im Hinblick auf die Referenzsequenz als solche erkannt. Alle Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, wichtige PR-Mutationen, aber auch alle anderen klinischen und Therapiedaten der untersuchten Patienten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengetragen und ausgewertet.



**Abbildung 9: Programmfenster von SeqMan™ II.** Hier können zwei oder mehr Sequenzen miteinander verglichen werden. Außerdem werden hier die Heterozygotien des HIV (mit Pfeil gekennzeichnet) überprüft bzw. als solche erkannt und manuell nachbearbeitet (Screenshot).

### 3.1.11 Plasmidpräparationen

Präparative und analytische Plasmidisolierungen (Mini-, Maxi-, Gel-Extraktionen, PCR-Produktaufreinigungen) wurden mit Reagenzsystemen der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode (Birnboim *et al.*, 1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Die DNA wurde zum Schluss je nach weiterem Gebrauch entweder in Reinstwasser oder EB-Puffer aufgenommen.

Der DNA-Gehalt wurde spektrometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 3.1.12 *In vitro* Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe des „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis System“ (Stratagene, La Jolla, USA) eingeführt. Dafür wurden Primer nach der Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

berechnet, wobei %GC für den GC-Gehalt und %mismatch für den Gehalt an nicht komplementären Basen steht. Das zu mutierende Plasmid wurde dann mit zwei zueinander überwiegend komplementären Oligonukleotiden, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion nach folgendem Schema eingesetzt:

5 µl Reaktionspuffer  
 x µl Plasmid (50 ng/µl)  
 x µl Oligonukleotid A (125 ng/µl)  
 x µl Oligonukleotid B (125 ng/µl)  
 1 µl dNTP-Mix  
 1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

**PCR-Bedingungen:**

Denaturierung der DNA-Matrize	95°C	30 sec	} x 18
Denaturierung der DNA-Matrize	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	55°C	1 min	
Extension der Oligonukleotide	68°C	12 min	
Extension der Oligonukleotide	68°C	15 min	

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Sequenz der Oligonukleotide und Größe des Plasmids angepasst. Dabei wird das Plasmid denaturiert und die Primer können sich anlagern. Die *PfuTurbo* DNA Polymerase vervollständigt die Plasmidsequenz mit einem daraus resultierenden nicht geschlossenen zirkulären Strang. Diese mutierten Stränge bleiben bei dem nachfolgenden Verdau mit *DpnI* (1 µl *DpnI*, 1 h, 37°C) erhalten, da dieses Enzym nur die parentalen, methylierten, nicht mutierten Plasmidstränge verdaut. Für die Transformation in *E. coli* wurden jeweils 1 µl des Ansatzes und 150 µl XL1-Bakterien verwendet.

**3.1.13 DNA-Standardmethoden**

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis *et al.* (1982) oder nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

- *Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen*  
 Hierbei werden pro 1 µg der zu schneidenden DNA 1 bis 6 U Enzym in einem Ansatz mit einer einfachen Konzentration an entsprechendem Puffer und Reinstwasser verwendet. Die Restriktionsansätze werden 1-2 h bei 37°C inkubiert.
- *Ligation von DNA mit T4-Ligase*  
 Bei Ligationen wurde 1 µl (1 Weiss Unit) Ligase für 20-30 ng DNA verwendet. Die Ligationsansätze mit einfachem Ligationpuffer und Reinstwasser wurden bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.
- *Gel-Extraktion von DNA*

## **3.2 Bakterienkultur**

### **3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation**

Für die Transformationen wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue bzw. JM109 verwendet. Um kompetente Bakterien zu erzeugen, wurden 200 ml LB-Medium mit 5 ml frischer Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Die auf Eis abgekühlten Bakterien wurden bei 4°C und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem TSB-Puffer resuspendiert. Die Bakterien konnten dann direkt für die Transformation eingesetzt oder in Aliquots aufgeteilt bei -80°C gelagert werden.

### **3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien**

100 µl der kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes bzw. ca. 1 ng Plasmid-DNA vermischt, für 20 min auf Eis gestellt, 1 min bei 42°C inkubiert und noch mal für 3-5 min auf Eis gestellt. Die Transformanten wurden schließlich auf antibiotikumhaltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

### **3.2.3 Langzeitlagerung von Bakterien**

Von einer dichten Bakterienvorkultur wurde 1 ml entnommen, mit 500 µl 50% Glycerin vermischt (Endkonzentration: 16,7%) und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

### **3.2.4 Kulturen zur Plasmidisolierung**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide verfügen über ein Ampicillin-Resistenzgen, so dass durch Zugabe von 100 µg/ml Antibiotikum (Ampicillin = Amp) sowohl in Flüssigmedium als auch in Agarplatten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden konnte. Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Amp-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Rotationsinkubator bei 37°C wachsen gelassen. Kulturen für die präparative Plasmidisolierung wurden in 200 ml LB-Amp-Medium in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angesetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

### 3.3 „Frameshift“-Assay

#### 3.3.1 Konstruktion der Plasmide

Um die Frameshifffeffizienzen von HI-Viren von verschiedenen Patienten zu untersuchen, wurde die p1-Frameshiftregion mittels der Primer p6-4-fs-KpnI (*fw*) und p6-5-fs-BamHI (*rev*) amplifiziert und via *KpnI/BamHI*-Schnittstellen in den Dual-Luciferase-Vektor pDual-HIV(-1) (Dulude *et al.*, 2006) kloniert. Die HxB2-p1-Region wurde als *wt*-Kontrolle entsprechend kloniert. Die so entstandenen Konstrukte enthalten zwischen den Gensequenzen der *Renilla* und *Firefly* Luciferase die HIV-1 Frameshiftregion, wobei der Leserahmen für die *Firefly* Luciferase um -1 verschoben ist. Diese wird nur dann synthetisiert, wenn bei der Translation ein Frameshiftereignis stattfindet. Das *in-frame* Kontrollplasmid pDual-HIV(0) (Dulude *et al.*, 2006) wurde für die Kontrolle der Translation der *Firefly* Luciferase im Verhältnis zu der *Renilla* Luciferase genutzt. Im Unterschied zu pDual-HxB2 ist die slippery site in diesem Vektor mutiert und um eine zusätzliche Base, in diesem Fall Adenin, erweitert, so dass einerseits kein Frameshift erfolgen kann und andererseits die *Firefly* Luciferase in den Leserahmen der *Renilla* Luciferase gebracht wird. Somit werden beide Markerproteine im gleichen Verhältnis exprimiert.

#### 3.3.2 Zellkulturmethoden

Die hier verwendete adhärente Zelllinie C33a wird bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 80-90% Luftfeuchtigkeit in geeignetem Medium in Zellkulturflaschen gehalten. Alle Arbeiten mit der Zelllinie wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden sie zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Durch leichtes Schlagen der Kulturflaschen gegen die Handfläche wurden die noch anhaftenden Zellen abgelöst. Die Zellen wurden in 15 ml Medium resuspendiert und danach in neue Gewebekulturgefäße je nach Dichtegrad 1:3 bis 1:12 aufgeteilt.

#### 3.3.3 Transfektion der C33a-Zellen

Für analytische transiente Transfektionsanalysen wurden 8 x 10<sup>4</sup> Zellen 24 h vor der Transfektion in 12-Loch-Gewebekulturplatten in Dulbecco's modified Eagle Medium (Invitrogen)

unter Zusatz von 10% FBS ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion zu 40-50% konfluent waren.

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

### 3.3.4 Transiente Transfektion mittels der Calciumphosphat-Präzipitation

Für die Transfektion wurden je Ansatz 1 µg DNA auf ein Volumen von 28 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Nach der Zugabe von 30,6 µl HBS-Puffer sowie 3 µl CaCl<sub>2</sub> wurden die Ansätze sofort durch Schütteln vermischt, um eine vollständige Komplexierung der DNA mit Calciumphosphat zu ermöglichen. Anschließend wurden die Transfektionsansätze 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen gegeben, die Platten danach leicht geschüttelt und bis zur Ernte für 40-48 h in den Brutschrank gestellt. Nach 16-24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 3.3.5 Ernte der transfizierten Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität

Nach dem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen in Lysispuffer (Passive Lysis Buffer, Promega) aufgenommen. Die Messung der *Renilla* und *Firefly* Luciferaseaktivität (RLU) wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay Kit von Promega im Victor<sup>2</sup> (Perkin-Elmer) durchgeführt. Dieses System erlaubte die sequentielle Messung der *Firefly* und *Renilla* Luciferase in einem Reagenzgefäß. Zunächst wurden 100 µl vom sogenannten Luciferase Assay Buffer II pipettiert. Dabei wurde dem Zelllysate *Firefly*-Luciferase-Substrat Luciferin zugeführt. Nach der Messung der Luciferaseaktivität wurden 100 µl von einem weiteren Puffer zugegeben. Das Stop&Glo-Reagenz quencht die Lumineszenz der *Firefly* Luciferase und enthält gleichzeitig Coelenterazin, ein Substrat der *Renilla* Luciferase. Die Aktivität dieser Luciferase konnte direkt nach der Zugabe gemessen werden. Die Frameshift-effizienzen wurden dann anhand der folgenden Formel berechnet:

$$X \% = \frac{\text{RLU Firefly (pDual-wt/mut)} / \text{RLU Renilla (pDual-wt/mut)}}{\text{RLU Firefly (pDual-HIV(0))} / \text{RLU Renilla (pDual-HIV(0))}} \times 100$$

### 3.4 Fitness-Assay

#### 3.4.1 Konstruktion der Plasmide

Für die Bestimmung der Replikationseffizienz der im Frameshift-Assay untersuchten Klone wurde die *pol*-Region aus dem entsprechenden Patientenmaterial amplifiziert und kloniert. Das amplifizierte Fragment enthielt neben den kodierenden Sequenzen für die Protease und reverse Transkriptase den C-terminalen *gag*-Bereich mit der zuvor untersuchten *p1*-Frameshiftregion. Die Amplifikation erfolgte in einer semi-nested PCR, wobei die Primer jeweils an ihren 5'-Enden mit einer Restriktionsstelle versehen sind. Die Amplifikate wurden mit den Enzymen *ApaI* und *NheI* sowie der Vektor *pNL4.3ΔPRT5'* mit *ApaI* und *XbaI* geschnitten und anschließend ligiert, wobei die entstehenden Basenüberhänge der Restriktionsenzyme *NheI* und *XbaI* zueinander kompatibel waren. Der Vektor *pNL4.3ΔPRT5'* enthielt das provirale HIV-1 Genom mit einer 1,2 kB-Deletion im *pol*-Gen (s. 2.4.3), so dass eine Klonierung ohne vorherige Gel-Extraktion erfolgen konnte. Die entstandenen Konstrukte wurden zunächst mittels einer Restriktionsanalyse auf erfolgreiche Insertion überprüft. Die dabei ausgewählten Klone wurden im Bereich der Insertion sequenziert und verifiziert.

#### 3.4.2 Herstellung rekombinanter infektiöser HIV-1 (Virusstocks)

Für die Expression rekombinanter infektiöser Viren wurden die durch Klonierung hergestellten Plasmide mit einem full-length HIV-Genom in 293T-Zellen transfiziert. Die Verwendung der 293T-Zellen verhindert hierbei die unerwünschte Rekombination der viralen DNA, da diese Zellen nicht von den freigesetzten rekombinanten HI-Viren reinfiziert werden können.

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in 8 ml DMEM-Vollmedium in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen ausgesät, so dass bei der Transfektion eine Konfluenz von 40-60% erreicht werden konnte. Am Tag der Transfektion wurden 2,5 µg des *full-length* HIV-Genomplasmids sowie 2,5 µg *pBSSK<sup>+</sup>*-Plasmid als unspezifische Träger-DNA mit DMEM-Vollmedium auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt und nach Zugabe 30 µl SuperFekt Transfection Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das SuperFekt Transfection Reagent ermöglicht durch Komplexierung mit der Plasmid-DNA deren Eintritt in die Zelle. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde die SuperFect-DNA-Lösung in 1 ml Vollmedium auf die Zellen getropft und 3 h bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und in 8 ml Vollmedium kultiviert. Nach ca. 48 h wird der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 300

g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der so gewonnene Virusstock wurde auf Eis aliquotiert und bei -70°C gelagert.

### 3.4.3 Quantitative Bestimmung der Virusinfektiösität (Virustitration)

Der Einsatz der Virusstocks in der Wachstumskinetik erfordert die Kenntnis der Infektiösität der einzelnen Rekombinanten. Der infektiöse Titer wird als Kehrwert der Verdünnung definiert, bei der statistisch die Hälfte der infizierten Kulturen reagiert. Dieser Wert wird auch als *tissue culture infectious dose 50%* (TCID<sub>50</sub>) bezeichnet. Hierfür wird eine serielle Endpunkttitration auf CEMx174-Zellen sowie ein anschließender HIV-1 p24-ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt.

Auf 96-Loch-Platten wurden 180 µl der 1:10 verdünnten Virusstocks als Vierfachbestimmung aufgetragen und 10-12mal jeweils 1:3 in 120 µl vorgelegtem RPMI-Vollmedium verdünnt. Zu jedem Ansatz dieser Verdünnungsreihe wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 5·10<sup>3</sup> CEMx174-Zellen gegeben. Als Kontrolle diente virusfreie Zellsuspension. Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C im CO<sup>2</sup>-begasten Brutschrank wurden anhand des zytopathischen Effekts diejenigen Verdünnungen ausgewählt, deren Infektion im p24-Antigen-Assay nachgewiesen werden sollte. Der zytopathische Effekt (CPE) äußert sich in der Ausbildung multinukleärer Riesenzellen (Synzytien). Diese morphologische Veränderung entsteht durch Fusion einzelner Zellen, die im Spätstadium der Infektion platzen, wodurch die Zellen absterben und virushaltiges Material freigesetzt wird. Hierbei wird der CXCR4-Tropismus des pNL43-Stamms genutzt, denn im Gegensatz zu CCR5-tropen Viren ist bei CXCR4-tropen eine Synzytienbildung möglich.

Der Endpunkt der Titration wurde mit Hilfe eines HIV-1 p24-Antigen-Assays ermittelt, so dass die TCID<sub>50</sub> der hergestellten Virusstocks anhand der von Spearman und Kärber entwickelten Formel zur Berechnung der Infektiösität bestimmt werden konnte (Spearman, 1908; Kärber, 1931).

#### Berechnung der TCID<sub>50</sub> nach Spearman-Kärber

$$TCID_{50}/mL = x_k + \frac{d}{2} - d \sum_{i=0}^k h_i$$

$x_k$  = höchste Verdünnung, bei der in allen Ansätzen eine Infektion nachgewiesen wurde

$d$  = Verdünnungsfaktor

$\sum_{i=0}^k h_i$  = Summe der Anteile an positiven Ansätzen der jeweiligen Verdünnung

### 3.4.4 Wachstumskinetik einer *in vitro* HIV-Infektion

Für die vergleichende Untersuchung der Replikationskapazität der hergestellten Virusstocks wurden CEMx174-Zellen mit einer infektiösen Dosis (*multiplicity of infection, m.o.i.*) von 0,01 infiziert, wobei eine *m.o.i.* von 0,01 einer infektiösen Einheit TCID<sub>50</sub> pro hundert Zellen entspricht. Durch tägliche Abnahmen der Zellkulturüberstände wurde der Verlauf der Virusproduktion durch Quantifizierung des Kapsidproteins p24 verfolgt.

Zunächst erfolgte die Infektion von  $4 \cdot 10^5$  CEMx174-SEAP-Zellen in einem Volumen von 1 ml RPMI-Vollmedium mit dem jeweiligen Virusstock mit einer infektiösen Einheit pro hundert Zellen (*m.o.i.* 0,01) sowie die anschließende Inkubation der Ansätze für 2 Stunden im Feuchtbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach der Abnahme von 125 µl Inokulum zur späteren Abschätzung der eingesetzten Viruspartikel (Input) wurden die infizierten Zellen zwei Mal durch Zentrifugation für 10 min bei 100 g in 10 ml RPMI gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4 ml Medium aufgenommen und die Zelldichte somit auf  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Nach Abnahme von 500 µl als Startwert ( $t_0$ ) wurden pro Virusstock 2x1 ml auf 24-Loch-Platten ausgesät (Doppelbestimmung). Als Kontrolle wurden nichtinfizierte Zellen mitgeführt. Während der 6-tägigen Inkubation der Zellen bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> wurden alle 24 h 500 µl Zellkulturüberstand abgenommen und durch 500 µl Vollmedium ersetzt. Bei der letzten Abnahme wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 100 g und 4°C 10 min pelletiert, der Überstand abgenommen und aliquotiert. Die gesammelten Zellpellets und die Kulturüberstände wurden bei -70°C gelagert. Die Wachstumskinetik der rekombinanten HIV-1 wurde durch die Quantifizierung des Kapsidproteins p24 aus Zellkulturüberständen mittels eines p24-Antigen ELISA ermittelt.

### 3.4.5 HIV p24-Antigen Assay

Der Nachweis sowie die Quantifizierung des Kapsidproteins p24 aus Titrationsansätzen und den Zellkulturüberständen der Wachstumskinetiken wurde mittels eines HIV-1 p24-Antigen Assays von AALTO nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Verdünnung des Standards in Medium angesetzt wurde.

## **3.5 siRNA-Assay**

### **3.5.1 Transfektion der C33a-Zellen**

Für analytische transiente Transfektionsanalysen mit siRNA wurden  $8 \times 10^4$  Zellen 24 h vor der Transfektion in 12-Loch-Gewebekulturplatten in Dulbecco's modified Eagle Medium (Invitrogen) unter Zusatz von 10% FBS, jedoch ohne Antibiotika, ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion zu 40-50% konfluent waren.

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

### **3.5.2 Transiente Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000**

Die transiente Transfektion der siRNA und der Plasmide erfolgte mittels Lipofectamine 2000, welches Liposom-Nukleinsäure-Komplexe bildet, die dann von der Zelle in das Zytoplasma aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurden pro Ansatz jeweils zwei Eppendorfgefäße vorbereitet. In einem Eppendorfgefäß wurden 200 ng DNA sowie 0,5 µl siRNA (100 µM) zu den vorliegenden 98,5 µl Opti-MEM gegeben. In einem anderen Eppendorfgefäß wurden 2 µl Lipofectamine 2000 mit 98 µl Opti-MEM pro Ansatz vermischt. Anschließend wurden die Transfektionsansätze 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann miteinander vermischt. Nach erneuter Inkubation von 20 min wurden die Liposom-Nukleinsäurekomplexe vorsichtig auf die Zellen gegeben, die Platten danach leicht geschüttelt und bis zur Ernte für 40-48 h in den Brutschrank gestellt. Nach 16-24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die Effizienz der Transfektion wurde anhand einer GFP-Kontrolle überprüft.

### **3.5.3 Ernte der transfizierten Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität**

Nach dem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen in Lysispuffer (Passive Lysis Buffer, Promega) aufgenommen. Die Messung der *Renilla* und *Firefly* Luciferaseaktivität (RLU) wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay Kit von Promega im Victor2 (Perkin-Elmer) durchgeführt.

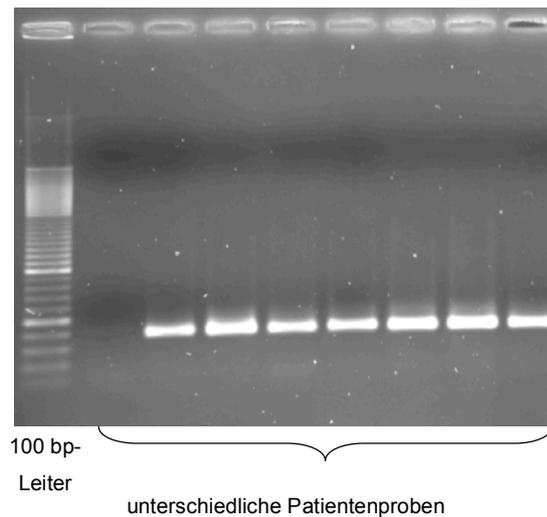
### **3.6 Statistische Analysen**

Statistische Analysen, Abhängigkeit bzw. Korrelation zweier Variablen, wurden mit dem exakten Test nach Fisher bzw. dem Chi-Quadrat-Test mittels einer Kontingenztafel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bei einem Signifikanzniveau von 5% als signifikant betrachtet ( $p$ -Werte $<0,05$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Amplifikation und Sequenzierung des C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Bereichs

Für die Untersuchung standen Seren zur HIV-Resistenzanalyse aus der Routinediagnostik zur Verfügung. Die Amplifikation der Proben erfolgte mittels der Primer p6-1 und p6-2 in einer RT-PCR (Abbildung 10). Die gleichen Primer wurden für die Sequenzierung verwendet. Die Nachweisgrenze der PCR lag bei 50 Kopien/ml und die Spezifität umfasste fast alle Subtypen von HIV-1. Subtyp O konnte wegen der großen Abweichung im Vergleich zu den anderen Subtypen nicht amplifiziert werden.



**Abbildung 10: RT-PCR mit den Primern p6-1 und p6-2 und RNA-Proben von 8 Seren.** Auftrennung von je 5 µl des RT-PCR-Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel. In der ersten Spur konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden, aufgrund einer Viruslast von unter 50 Kopien/ml.

Im Folgenden wurden die erhaltenen Sequenzen auf Veränderungen innerhalb der Schnittstellen sowie im p1-Frameshiftbereich untersucht.

## 4.2 Änderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen der Protease in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten

Der untersuchte gag/pol-Bereich enthielt vier von 12 Proteaseschnittstellen (CS, cleavage site), nämlich die p7/p1-, p1/p6-gag-, p7/TFP- und TFP/p6-pol-Schnittstelle. Jeder Schnittstellenbereich umfasste jeweils fünf Aminosäuren (AS) beiderseits der Schnittstelle (Abbildung 11). Die Schnittstelle p7/TFP zeigte an den Positionen 01 bis 03 keine Veränderungen. Die restlichen Positionen finden sich, bedingt durch den programmierten Frameshift bei HIV-1, einerseits in der Gag-Schnittstelle p7/p1, andererseits in der TFP/p6-pol-Schnittstelle wieder, so dass die Schnittstelle p7/TFP nicht separat ausgewertet wurde.

CS p7/p1	E R Q A N - F L G K I
	428 429 430 431 432      433 434 435 436 437
CS p1/p6-gag	R P G N F - L Q S R P
	444 445 446 447 448      449 450 451 452 453
CS p7/TFP	E R Q A N - F F R E D
	428 429 430 431 432      01 02 03 04 05
CS TFP/p6-pol	E D L A F - L Q G K A
	04 05 06 07 08      09 10 11 12 13

**Abbildung 11: Sequenzen der Schnittstellen p7/p1, p1/p6-gag p7/TFP und TFP/p6-pol.** Unterhalb sind die Aminosäurepositionen im HxB2-Referenzstamm aufgezeichnet.

### 4.2.1 Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen in therapie-naiven Isolaten ohne primäre PR- und RT-Resistenzmutationen

Die Untersuchung der therapie-naiven Isolate zeigte eine Vielzahl von Schnittstellenmutationen, von denen eine Reihe mit einer Häufigkeit von über 1% in diesem Kollektiv gefunden wurde (Tabelle 2). Von diesen fanden sich sechs Mutationen an der Schnittstelle p7/p1 (E428G, R429G/K, K436R und I437L/V) und sieben an der Schnittstelle p1/p6-gag (L449I/P, S451G/N/R, P453L/T). Die Schnittstelle TFP/p6-pol war diejenige mit den meisten Austauschen und der höchsten Anzahl von veränderten Positionen. Während die beiden C-terminalen Gag-Schnittstellen an sechs bzw. sieben Positionen keine Veränderungen aufwiesen, zeigte die TFP/p6-pol-Schnittstelle nur an einer Position keine

Änderungen. Die Mutationen D05N, L09P und K12E in dieser Schnittstelle waren besonders häufig, alle drei wurden bei über 50% der therapie-naiven Viren beobachtet. Eine auffällige Variabilität zeigte die Position D05. Hier fanden sich vier verschiedene Austausche (D05G/S/N/T) in jeweils mehr als 1% dieses therapie-naiven Kollektivs.

Innerhalb der Subtypengruppen gab es erhebliche Unterschiede bei der Häufigkeit einzelner Mutationen. Die Mutationen K436R, L449P, P453L, D05N, F08S, L09Q, G11R und K12E kamen signifikant häufiger bei den non-B Subtypen vor ( $p < 0,05$ ). Eine signifikant erhöhte Prävalenz beim Subtyp B zeigten hingegen die Mutationen L09P und Q10E ( $p < 0,05$ ).

			Subtyp B (n=644)		non-B Subtypen (n=287)		Gesamt (n=931)	
			n =	%	n =	%	n =	%
Gag	p7/p1	E428G	14	2,2	4	1,4	18	1,9
		R429G	8	1,2	2	0,7	10	1,1
		R429K	21	3,3	3	1,0	24	2,6
		K436R	42	6,5	49	17,1	91	9,8
		I437L	25	3,9	15	5,2	40	4,3
		I437V	20	3,1	3	1,0	23	2,5
	p1/p6-gag	L449I	5	0,8	5	1,7	10	1,1
		L449P	48	7,5	190	66,2	238	25,6
		S451G	16	2,5	2	0,7	18	1,9
		S451N	123	19,1	55	19,2	178	19,1
		S451R	15	2,3	4	1,4	19	2,0
		P453L	34	5,3	29	10,1	63	6,8
		P453T	26	4,0	22	7,7	48	5,2
	Pol	TFP/p6-pol	E04K	20	3,1	5	1,7	25
D05N			441	68,5	260	90,6	701	75,3
D05T			23	3,6	13	4,5	36	3,9
D05S			11	1,7	2	0,7	13	1,4
D05G			14	2,2	2	0,7	16	1,7
L06V			6	0,9	3	1,0	9	1,0
A07V			18	2,8	4	1,4	22	2,4
F08L			7	1,1	7	2,4	14	1,5
F08S			4	0,6	8	2,8	12	1,3
L09Q			22	3,4	183	63,8	205	22,0
L09P			590	91,6	105	36,6	695	74,7
Q10E			18	2,8	2	0,7	20	2,1
G11R			55	8,5	63	22,0	118	12,7
K12E	316	49,1	205	71,4	521	56,0		

**Tabelle 2: CS-Mutationen mit einer Häufigkeit von über 1% bei TN-Isolaten, sowie deren Verteilung und Häufigkeit in den Subtypengruppen B und non-B.**

#### 4.2.2 Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen in therapie-naiven Isolaten mit primären PR- und RT-Resistenzmutationen

Beim Vergleich der Änderungen der Schnittstellen in therapie-naiven Isolaten mit und ohne primäre PR- oder RT-Resistenzmutationen fanden sich deutliche Unterschiede (Tabelle 3). Die Gag-Schnittstellen p7/p1 und p1/p6 wiesen Mutationen auf, die signifikant häufiger bei therapie-naiven Viren mit primärer Resistenz in der Protease vorkamen (A431V:  $p < 0,01$ ; I437V und R452S:  $p < 0,05$ ). Die CS-Mutation A431V trat auch signifikant häufiger bei den Isolaten mit RT-Resistenzmutationen ( $p < 0,05$ ) auf.

		TN ohne primäre PR- und RT-Resistenzmutationen (n=931)		TN mit RT-Resistenzmutationen (n=68)		TN mit primären PR-Resistenzmutationen (n=23)	
		n =	%	n =	%	n =	%
p7/p1	A431V	5	0,5	3	4,4	4	17,4
	I437V	23	2,5	2	2,9	3	13,0
p1/p6-gag	R452S	0	0,0	0	0,0	1	4,3
TFP/p6-pol	D05S	13	1,4	2	2,9	2	8,7
	Q10E	20	2,1	0	0,0	3	13,0

**Tabelle 3: CS-Mutationen bei TN-Isolaten mit primären PR- oder RT-Resistenzmutationen.**

Die CS-Mutationen D05S und Q10E in der TFP/p6-pol-Schnittstelle machten ebenfalls in der Gruppe mit primären Resistenzmutationen in der Protease einen signifikant größeren Anteil aus ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Unterschiede der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen von HI-Viren in therapie-naiven und -erfahrenen Patienten

Um die Anpassung der Schnittstellen bei stattgefundenener PI-Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurden therapie-naive HIV-Isolate ohne primäre Resistenz in der Protease oder reversen Transkriptase mit PI-resistenten HI-Viren nach einem Therapieversagen verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von HIV-CS-Polymorphismen bei HIV Subtyp B und non-B Subtypen wurde die Therapieanpassung in beiden Gruppen getrennt analysiert.

##### **Therapie-assoziierte CS-Mutationen bei Isolaten vom Subtyp B**

Einige Veränderungen waren signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten zu finden und wurden dementsprechend, im Gegensatz zu den natürlichen Polymorphismen, deren Häufigkeit therapie-unabhängig war, als therapie-assoziiert definiert. Mutationen an jeweils

vier Positionen konnten in den beiden Gag-Schnittstellen als therapie-assoziiert identifiziert werden, wohingegen die Pol-Schnittstelle, die Variabilität an den meisten Positionen gezeigt hatte, therapie-assoziierte Mutationen nur an einer Position zeigte.

In der Schnittstelle p7/p1 waren es die Mutationen E428D, A431V, G435E und I437V, die signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen HIV-Isolaten mit mindestens einer Resistenzmutation in der Protease vorkamen ( $p < 0,01$ ), wobei A431V sowie I437V sogar hochsignifikant waren ( $p < 0,0001$ ) (Tabelle 4).

		TN ohne primäre PR-Mutationen (n=644)		TE mit primären PR-Mutationen (n=324)	
		n =	%	n =	%
p7/p1	E428D	1	0,2	10	3,1
	A431V	5	0,8	124	38,3
	G435E	0	0,0	5	1,5
	I437V	20	3,1	58	17,9
p1/p6-gag	L449F	1	0,2	27	8,3
	L449V	5	0,8	12	3,7
	S451T	0	0,0	14	4,3
	R452S	0	0,0	5	1,5
	P453A	0	0,0	8	2,5
	P453L	34	5,3	84	25,9
	P453V	0	0,0	3	0,9
TFP/p6-pol	D05G	14	2,2	25	7,7
	D05S	11	1,7	38	11,7

**Tabelle 4: Therapie-assoziierte CS-Mutationen im Vergleich zwischen therapie-naiven Isolaten ohne primäre PR-Resistenzmutationen und therapie-erfahrenen mit primärer PI-Resistenz beim Subtyp B.**

Die meisten therapie-assoziierten CS-Mutationen zeigte die Proteaseschnittstelle p1/p6-gag (L449F/V, S451T, R452S, P453A/L/V;  $p < 0,05$ ). Zu den hochsignifikant akkumulierenden Mutationen bei therapie-erfahrenen Isolaten zählten die Mutationen L449F, S451T und P453L ( $p < 0,0001$ ). Die CS-Mutation P453L alleine war deutlich häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten zu finden ( $p < 0,0001$ ), wohingegen P453L in Kombination mit L449P in beiden Gruppen gleich häufig vorkommt (TN: 28/644 (4,3%) vs. TE: 15/324 (4,6%)).

Auch in der Pol-Schnittstelle TFP/p6 traten therapie-assoziierte Mutationen auf, D05G und D05S. Beide wurden signifikant häufiger in der Gruppe von therapie-erfahrenen Isolaten beobachtet ( $p < 0,0001$ ).

**Therapie-assoziierte CS-Mutationen in der Gruppe der non-B Subtypen**

In der Gruppe der non-B Subtypen fanden sich identische therapie-assoziierte CS-Mutationen (A431V, R452S und P453L;  $p < 0,01$ ) wie bei HIV Subtyp B, aber auch zusätzliche Mutationen (Tabelle 5).

Die vier Veränderungen K436R, L449H, S451G und Q10E, die bei therapie-erfahrenen HIV-Viren des Subtyps B keine Signifikanz erreicht haben, zeigten hier deutlich höhere Prävalenz im therapie-erfahrenen Kollektiv ( $p < 0,05$ ). Bemerkenswert war, dass zwei dieser Positionen, L449 und S451, beim Subtyp B ebenfalls als therapie-assoziiert aufgefallen sind, jedoch mit anderen Aminosäureaustauschen (Subtyp B: L449F und S451T).

		TN ohne primäre PR-Mutationen (n=287)		TE mit primären PR-Mutationen (n=63)	
		n =	%	n =	%
p7/p1	A431V	0	0,0	22	34,9
	K436R	49	17,1	19	30,2
p1/p6-gag	L449H	0	0,0	3	4,8
	S451G	2	0,7	3	4,8
	R452S	0	0,0	4	6,3
	P453L	29	10,1	22	34,9
TFP/p6-pol	Q10E	2	0,7	3	4,8

**Tabelle 5: Therapie-assoziierte CS-Mutationen im Vergleich zwischen therapie-naiven Isolaten ohne primäre PR-Resistenzmutationen und therapie-erfahrenen mit primärer PI-Resistenz in der non-B-Subtypengruppe.**

**4.2.4 Korrelationen der therapie-assoziierten CS-Mutationen mit resistenz-assoziierten Proteasemutationen**

Die vorher gefundenen therapie-assoziierten CS-Mutationen wurden im Weiteren auf eine spezifische Assoziation mit bekannten PR-Mutationen bei therapie-erfahrenen Isolaten untersucht. Wegen der geringen Fallzahlen bei den non-B Subtypen wurde die Analyse der Korrelationen nur innerhalb des Subtyps B durchgeführt. Demnach wurden für diesen Vergleich die therapie-erfahrenen Isolate des Subtyps B je nach Veränderung in Subgruppen unterteilt und immer mit den restlichen HIV-Isolaten verglichen. Es wurden nur die Schnittstellenmutationen untersucht, die bei mehr als 10 Isolaten gefunden wurden.

In der Gruppe der 324 therapie-erfahrenen Patienten mit Viren, die mindestens eine primäre PI-Mutation aufwiesen, konnte eine Vielzahl an signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten Mutationen in den Gag-Schnittstellen p7/p1 und p1-p6-gag sowie in der Pol-Schnittstelle TFP/p6-pol und den resistenz-assoziierten Proteasemutationen beobachtet werden (Tabelle 6).

Die therapie-assoziierte CS-Mutation A431V in der Schnittstelle p7/p1 konnte im Vergleich zu den anderen CS-Mutationen mit den meisten PR-Mutationen signifikant korreliert werden, sie war jedoch auch bei über einem Drittel der therapie-erfahrenen Isolate vertreten. Bei sechs von den neun korrelierten PR-Mutationen lag der p-Wert sogar unter 0,01 (L24I, M46I/L, I54V, L76V und I84V). Diese Schnittstellenmutation zeigte außerdem auch negative Korrelationen. Sie wurde signifikant seltener bei therapie-erfahrenen Isolaten mit den Protease-Resistenzmutationen D30N, G48V, N88D und L90M beobachtet ( $p < 0,05$ ).

PR-Mutation	p7/p1				p1/p6-gag		TFP/p6-pol		TE gesamt
	E428D	A431V	K436R	I437V	L449F	P453L	D05G	D05S	
	n=10	n=124	n=29	n=58	n=27	n=84	n=25	n=38	n=324
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
L24I	0,0	26,6	3,4	6,9	14,8	7,1	8,0	10,5	11,4
D30N	20,0	0,8	0,0	5,2	18,5	13,1	12,0	0,0	5,9
M46I	40,0	49,2	27,6	29,3	40,7	44,0	32,0	34,2	34,3
M46L	10,0	24,2	13,8	8,6	11,1	8,3	8,0	7,9	13,9
I47A	10,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	4,0	0,0	0,3
G48V	0,0	2,4	17,2	13,8	3,7	1,2	8,0	15,8	6,8
I50V	0,0	0,8	0,0	6,9	3,7	4,8	4,0	7,9	2,2
I54A	20,0	1,6	6,9	6,9	0,0	3,6	0,0	10,5	1,9
I54L	10,0	4,8	0,0	5,2	22,2	7,1	4,0	5,3	5,9
I54V	10,0	51,6	48,3	50,0	33,3	29,8	48,0	52,6	34,6
L76V	0,0	8,1	0,0	5,2	3,7	2,4	0,0	7,9	3,4
V82A	20,0	41,1	55,2	48,3	22,2	20,2	52,0	47,4	33,0
V82F	30,0	5,6	3,4	3,4	0,0	3,6	0,0	5,3	2,8
V82T	0,0	8,9	3,4	8,6	0,0	1,2	0,0	13,2	5,2
I84V	20,0	38,7	13,8	24,1	40,7	53,6	20,0	31,6	25,3
N88D	20,0	1,6	0,0	3,4	29,6	11,9	8,0	0,0	6,8
N88S	10,0	1,6	10,3	0,0	3,7	1,2	0,0	0,0	1,5
L90M	30,0	55,6	58,6	65,5	74,1	66,7	56,0	71,1	63,3

**Tabelle 6: Korrelationen von therapie-assoziierten Veränderungen mit einigen resistenz-assoziierten PR-Mutationen.** Die erste Spalte zeigt eine Liste der PR-Mutationen, für die signifikante Korrelationen gefunden wurden. In der letzten Spalte sind die Häufigkeiten der PR-Mutationen unter allen therapie-erfahrenen Isolaten in % angegeben. In den übrigen Spalten sind die Häufigkeiten der jeweiligen PR-Mutationen mit der spezifischen CS-Mutation angegeben. Verglichen wurde immer die Gruppe der Isolate, die die Schnittstellenmutation haben, mit den restlichen, die diese nicht haben. Die signifikanten positiven Korrelationen sind in schwarzer Schrift auf grauem Hintergrund, die negativen Korrelationen in schwarz auf weißem Hintergrund dargestellt.

Die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation E428D konnte mit drei Proteasemutationen in Verbindung gebracht werden, I47A, I54A und V82F ( $p < 0,05$ ), wobei diese CS-Mutation als einzige mit der primären PR-Mutation I47A korrelierte.

K436R war hingegen die einzige Schnittstellenmutation, die mit der Proteasemutation N88S korreliert werden konnte ( $p < 0,01$ ). Außerdem waren auch die Proteasemutationen V82A und G48V mit dieser CS-Mutation assoziiert ( $p < 0,05$ ).

Die therapie-assoziierte CS-Mutation L449F war signifikant häufiger bei Isolaten mit den PR-Mutationen D30N, I54L und N88D zu finden ( $p < 0,01$ ) und war als einzige mit der Resistenzmutation I54L in der Protease korreliert. Die Veränderung L an der Position P453 war signifikant häufiger bei Isolaten mit den Proteasemutationen D30N, M46I, I84V und N88D vertreten ( $p < 0,05$ ). Negative Korrelationen zeigte diese therapie-assoziierte Schnittstellenmutation bei Isolaten mit G48V bzw. V82A ( $p < 0,05$ ).

Interessanterweise waren die CS-Mutationen I437V und D05S mit fast identischen Resistenzprofilen assoziiert, die sich nur im Hinblick auf die PR-Mutationen V82A und V82T unterschieden. Signifikant häufig mit diesen beiden CS-Änderungen wurden die vier Proteasemutationen G48V, I50V und I54A/V beobachtet ( $p < 0,05$ ). Dahingegen zeigte die D05G lediglich eine Assoziation mit der PR-Resistenzmutation V82A ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.5 Therapie-assoziierte Schnittstellenmutationen bei therapie-naiven Isolaten aus den Jahren 1987-1990**

Zusätzlich wurden die C-terminalen Gag- und N-terminalen Pol-Schnittstellen von HIV-Isolaten aus Zellkulturüberständen untersucht, die von HIV-infizierten Patienten in den Jahren 1987-1990, noch vor der HAART-Ära, gewonnen worden waren. Die Analyse zeigte vor allem die absolute Abwesenheit der meisten therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen, A431V, I437V, L449F/H/V, R452S und D05G/S (Tabelle 7). Die Mutationen K436R, S451G, P453L und Q10E konnten zwar schon beobachtet werden, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Prävalenz.

Bemerkenswert war außerdem die relativ hohe Prävalenz der Schnittstellenmutationen I437V und D05G/S im therapie-naiven Kollektiv nach 2001, die vor 1990 noch gar nicht zu beobachten waren.

ERGEBNISSE

		TN ohne primäre PR-Mutationen vor 1990 (n=94)		TN ohne primäre PR-Mutationen nach 2001 (n=931)		TE mit primären PR-Mutationen (n=387)	
		n =	%	n =	%	n =	%
p7/p1	E428D	0	0,0	5	0,5	11	2,8
	A431V	0	0,0	5	0,5	146	37,7
	G435E	0	0,0	0	0,0	5	1,3
	K436R	2	2,1	91	9,8	48	6,2
	I437V	0	0,0	23	2,5	61	15,8
p1/p6-gag	L449F	0	0,0	2	0,2	27	7,0
	L449V	0	0,0	7	0,8	14	3,6
	L449H	0	0,0	1	0,1	5	1,3
	S451T	0	0,0	2	0,2	16	4,1
	S451G	1	1,1	18	1,9	7	1,8
	R452S	0	0,0	0	0,0	9	2,3
	P453A	0	0,0	0	0,0	9	2,3
	P453L	3	3,2	63	6,8	106	27,4
	P453V	0	0,0	0	0,0	3	0,8
TFP/p6-pol	D05G	0	0,0	16	1,7	27	7,0
	D05S	0	0,0	13	1,4	13	10,3
	Q10E	1	1,1	20	2,1	13	3,4

**Tabelle 7: Therapie-assoziierte Schnittstellenmutationen in therapie-naiven HIV, die vor dem Einsatz von Proteaseinhibitoren archiviert wurden, im Vergleich zu Isolaten, die nach 2001 aus Seren HIV-infizierter Patienten isoliert wurden.**

### **4.3 Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich von HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten**

Einige der therapie-assoziierten HIV CS-Mutationen befinden sich in dem Genombereich (nc 2085-2137; Gag-AS: 432-449; Pol-AS: 01-18), der für den ribosomalen Frameshift verantwortlich ist. Die Nukleotidsequenzen wurden bei dieser Analyse nach Subtypengruppen getrennt betrachtet, da diese schon bei der Schnittstellenanalyse deutliche Unterschiede gezeigt haben. Es wurden die Sequenzen der therapie-naiven Isolate ohne PR-Mutationen mit den Isolaten therapie-erfahrener Patienten mit mindestens einer primären Resistenzmutation in der PR verglichen.

#### **4.3.1 Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich von HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten des Subtyps B**

Die Analyse der p1-Region zeigte äußerst viel Variabilität (Tabelle 8). Nur 22 von 52 Positionen wiesen keine Veränderungen bei Isolaten des Subtyps B auf. 8 Positionen waren in über 10% der untersuchten Isolate verändert. Besonders häufig von Veränderungen betroffen, mit über bzw. fast 50%, waren die Positionen G2097 (71,7%), U2110 (93,7%) und A2118 (49,1%).

Den größten Anteil an Austausch an der Position G2097 machte das Nukleotid Adenin aus. Dieser Austausch hatte im Gag-Leserahmen keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, im Pol-Leserahmen jedoch bedingte diese Mutation die Änderung D05N, welche aufgrund der homogenen Verteilung zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten zu den natürlichen Polymorphismen gezählt wurde (siehe 4.1).

Im Vergleich zum HxB2-Referenzstamm war die Position U2110 die am meisten von Veränderungen betroffene Position. Die Mutation U2110C hatte die Aminosäureänderung Y441H außerhalb der Schnittstellen im Gag-Leserahmen zur Folge, die entsprechend dem Nukleotidaustausch sehr häufig bei Subtyp-B-Isolaten vorkam (86,4%), ohne großen Unterschied zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten (TN: 567/644 (88,0%) vs. TE: 273/324 (84,3%)). Im Pol-Leserahmen betraf dieser Austausch die Position L09 an der Schnittstelle TFP/p6-pol und hatte ebenfalls mit der Mutation L09P keinen Unterschied zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten gezeigt.

Die häufigste Änderung an der Position A2118 war der Nukleotidaustausch von A nach G. Die daraus folgende Mutation der Aminosäureposition K12E im Pol-Leserahmen verhielt sich einem natürlichen Polymorphismus entsprechend, sie kam gleichermaßen häufig in therapie-

naiven und therapie-erfahrenen Isolaten vor. Im Gag-Leserahmen hatte die Nukleotidmutation A2118G keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz

Insgesamt fünf Positionen zeigten signifikante Unterschiede zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen HI-Viren (Tabelle 8). An drei Positionen führten die Mutationen zu dem Auftreten von CS-Mutationen, die unter Therapie selektioniert wurden und mit verschiedenen PR-Mutationen korreliert waren. Die beiden anderen Positionen lagen außerhalb der Gag-Schnittstellen und waren stille Mutationen im Pol-Leserahmen, d.h. sie führten nicht zu einem Aminosäureaustausch.

Der Nukleotidaustausch G nach A an der Position 2093 ( $p < 0,01$ ) hat die Schnittstellenmutation G435E (GGG  $\Rightarrow$  GAG) zur Folge, die signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten des Subtyps B gefunden wurde. Ähnlich verhielt es sich an der Position 2134. Hier traten zwei Nukleotidaustausche, zu Uracil und Guanin, signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen als bei therapie-naiven Isolaten auf (U:  $p < 0,0001$ ; G:  $p < 0,01$ ). Die Mutationen C2134U/G führten zu den therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen L449F/V (CUU  $\Rightarrow$  UUU; CUU  $\Rightarrow$  GUU). Auffallend bei der therapie-assoziierten Schnittstellenmutation L449F bzw. dem Nukleotidaustausch C2134U war, dass dadurch eine Abfolge von 7 Uracil entstand, ähnlich der slippery-site im Frameshift-regulierenden Bereich. Dem signifikanten Anstieg der Mutation A2098G ( $p < 0,0001$ ) bei therapie-erfahrenen HI-Viren lagen gleich zwei therapie-assoziierte Schnittstellenmutationen zugrunde. Eine in der Gag-Schnittstelle p7/p1, I437V (AUC  $\Rightarrow$  GUC), und eine in der Pol-Schnittstelle TFP/p6-pol, D05G (GAU  $\Rightarrow$  GGU). Die genauere Betrachtung dieses Bereichs zeigte, dass dieser Nukleotidaustausch auch zu der therapie-assoziierten Schnittstellenmutation D05S (AGU) führt, in Abhängigkeit von dem Polymorphismus G2097A (Tabelle 8). Dieser kodiert für die Aminosäure D05N (AAU) in Pol, die entsprechend dem Nukleotidaustausch sehr häufig im gesamten Kollektiv vorkam und somit als Polymorphismus gewertet wurde. Im Gag-Leserahmen hatte dieser Austausch keine Auswirkung auf die kodierte Aminosäure.

Die zwei anderen therapie-assoziierten Mutationen, C2108U und A2111C hatten keine Auswirkungen auf die Aminosäuren im Pol-Leserahmen. Im Gag-Leserahmen liegen diese beiden Positionen außerhalb der Schnittstellen p7/p1 und p1/p6-pol. Die Änderung an der Position 2108 führte zu der Aminosäuremutation S440F, die zwar nicht signifikant häufiger im therapie-erfahrenen Kollektiv vorkam, jedoch eine deutliche Tendenz zeigte (TN: 3/644 (0,5%) vs. TE: 6/324 (1,9%);  $p = 0,068$ ).

ERGEBNISSE

Pol	Gag	nc	Position in HxB2	TN (n=644)		TE (n=324)		
				n=	%	n=	%	
F01	F433	U	2085	0	0,0	0	0,0	
		U	2086	0	0,0	0	0,0	
		U	2087	0	0,0	0	0,0	
F02	L434	U	2088	0	0,0	0	0,0	
		U	2089	0	0,0	0	0,0	
R03	G435	A	2091	0	0,0	0	0,0	
		G	2092	0	0,0	0	0,0	
		G	2093	0	0,0	5	1,5	→ G2093A=G435E
E04	K436	G	2094	23	3,6	5	1,5	
		A	2095	3	0,5	2	0,6	
D05	I437	A	2096	47	7,3	31	9,6	
		G	2097	461	71,6	233	71,9	
		A	2098	46	7,1	65	20,1	→ G2097G+A2098G=I437V, D05G
L06	W438	U	2099	0	0,0	0	0,0	→ G2097A+A2098G=I437V, D05S
		C	2100	33	5,1	17	5,2	
		U	2101	0	0,0	0	0,0	
A07	P439	G	2102	0	0,0	0	0,0	
		G	2103	0	0,0	0	0,0	
		C	2104	18	2,8	3	0,9	
F08	S440	C	2105	0	0,0	0	0,0	
		U	2106	7	1,1	4	1,2	
		U	2107	7	1,1	5	1,5	
L09	Y441	C	2108	3	0,5	7	2,2	→ C2108U=S440F
		C	2109	4	0,6	1	0,3	
		U	2110	612	95,0	295	91,0	
Q10	K442	A	2111	24	3,7	22	6,8	→ U2110C+A2111C=Y441P
		C	2112	19	3,0	12	3,7	
		A	2113	4	0,6	1	0,3	
G11	G443	A	2114	35	5,4	13	4,0	
		G	2115	57	8,9	21	6,5	
		G	2116	0	0,0	0	0,0	
K12	R444	G	2117	19	3,0	9	2,8	
		A	2118	323	50,2	152	46,9	
		A	2119	3	0,5	0	0,0	
A13	P445	G	2120	0	0,0	1	0,3	
		G	2121	3	0,5	0	0,0	
		C	2122	0	0,0	0	0,0	
R14	G446	C	2123	0	0,0	0	0,0	
		A	2124	72	11,2	17	5,2	
		G	2125	0	0,0	0	0,0	
E15	N447	G	2126	0	0,0	0	0,0	
		G	2127	93	14,4	26	8,0	
		A	2128	0	0,0	0	0,0	
F16	F448	A	2129	0	0,0	0	0,0	
		U	2130	129	20,0	65	20,1	
		U	2131	0	0,0	0	0,0	
S17	L449	U	2132	0	0,0	0	0,0	
		U	2133	245	38,0	81	25,0	
		C	2134	11	1,7	41	12,7	→ C2134U=L449F
S18		U	2135	49	7,6	26	8,0	→ C2134G=L449V
		U	2136	101	15,7	55	17,0	
		C	2137	0	0,0	0	0,0	

**Tabelle 8: Vergleich der Nukleotidaustausche im p1-Bereich zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten des Subtyps B sowie deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.** Die vier Spalten links in der Tabelle geben die HxB2-Sequenzen wieder (Aminosäuresequenzen des Pol- und Gag-Leserahmens und Nukleotidsequenz mit den Positionen im HxB2-Referenzstammgenom). Die beiden großen Spalten spiegeln die Verteilung der Nukleotidaustausche im Vergleich zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten des Subtyps B wieder. Angegeben ist die Anzahl der Änderungen an der jeweiligen Position im Vergleich zu HxB2. Rechts von der Tabelle sind die signifikanten Änderungen der Nukleotide, sowie die dadurch entstehenden Aminosäureänderungen angegeben.

Die Änderung C an der Position A2111 bedingte die Aminosäure 441P, auch hier, analog zur Position 2098, nur unter Berücksichtigung der polymorphen Mutation U2110C, die zu der AS-Mutation 441H (CAC) führte. Die Aminosäure 441P (CAC  $\Rightarrow$  CCC) war, entsprechend der Nukleotidänderung A2111C, signifikant häufiger bei Isolaten mit mindestens einer primären PR-Mutation (TN: 3/644 (0,5%) vs. TE: 8/324 (2,5%);  $p < 0,01$ ).

#### **4.3.2 Analyse der Nukleotidsequenz im p1-Frameshiftbereich in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten in der Subtypengruppe non-B**

Die p1-Region der Subtypengruppe non-B zeigte ähnliche Variabilität wie die Isolate vom Subtyp B. Hier wiesen 24 von 52 Positionen keine Veränderungen auf. 13 Positionen waren in über 10% dieser Isolate verändert. Besonders häufig von Veränderungen betroffen, mit über 50%, waren die sechs Positionen G2097 (96,3%), C2100 (79,4%), U2110 (98,3%), A2118 (70,9%), G2127 (50,3%) und U2135 (64,0%). Bei dieser Gruppe ist zu berücksichtigen, dass der Referenzstamm HxB2 als Subtyp B klassifiziert ist und dass die Gruppe aus Isolaten mit vielen verschiedenen Subtypen mit unterschiedlichen Konsensussequenzen gebildet wurde.

Die Position U2110 war die am meisten von Veränderungen betroffene Position bei non-B-Isolaten (Tabelle 9). Die Mutation von U nach A (61,1%) bildete darin den größten Anteil. Dieser Austausch verursachte die Aminosäuremutationen Y441N bzw. L09Q, die aufgrund ihres homogenen Vorkommens in den therapie-naiven und therapie-erfahrenen HI-Viren den natürlichen Polymorphismen zugeordnet wurden.

Sehr häufig kamen auch Veränderungen an der Position G2097 mit 96,3% vor. Gleich dem Subtyp B war hier ein Adenin am häufigsten zu finden, wobei auch hier kein Unterschied zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten deutlich wurde.

Die Veränderungen an den Positionen C2100, A2118 und G2127 zeigten im Einzelnen keine Unterschiede zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen HI-Viren.

Im Gegensatz dazu zeigte die Betrachtung der einzelnen Austausche an der Position U2135

einen signifikanten Unterschied und zwar in der Nukleotidmutation U2135A, die für die therapie-assoziierte Mutation L449H in der p1/p6-gag-Schnittstelle kodiert ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 9).

Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich an den Positionen A2096 und C2112. Änderungen an der Position A2096 waren häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten mit primären PR-Resistenzmutationen im Vergleich zu therapie-naiven HI-Viren ( $p < 0,05$ ). Bei der Betrachtung der einzelnen Nukleotidaustausche an dieser Position wurde deutlich, dass die Mutation A2096G, die die CS-Mutation K436R verursachte (AAG  $\Rightarrow$  AGG), dieser Signifikanz zugrunde lag.

Insgesamt waren die Mutationen an der Position C2112 zwar nicht bei therapie-erfahrenen Isolaten häufiger zu finden, im Detail jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Änderungen von C nach G an der Position 2112 führten zu der therapie-assoziierten Änderung der Aminosäureposition Q10E in der Pol-Schnittstelle TFP/p6-pol ( $p < 0,05$ ).

ERGEBNISSE

Pol	Gag	nc	Position in HxB2	TN (n=287)		TE (n=63)		
				n=	%	n=	%	
F01	F433	U	2085	0	0,0	0	0,0	
		U	2086	0	0,0	0	0,0	
		U	2087	0	0,0	0	0,0	
F02	L434	U	2088	0	0,0	0	0,0	
		U	2089	0	0,0	0	0,0	
R03	G435	A	2091	0	0,0	0	0,0	
		G	2092	0	0,0	0	0,0	
E04	K436	G	2093	0	0,0	0	0,0	
		G	2094	6	2,1	0	0,0	
D05	I437	A	2095	0	0,0	0	0,0	
		G	2096	50	17,4	19	30,2	→ A2096G=K436R
L06	W438	G	2097	278	96,9	59	93,7	
		A	2098	20	7,0	6	9,5	
A07	P439	U	2099	0	0,0	0	0,0	
		C	2100	241	84,0	37	58,7	
F08	S440	U	2101	0	0,0	0	0,0	
		G	2102	0	0,0	0	0,0	
L09	Y441	G	2103	0	0,0	0	0,0	
		C	2104	4	1,4	0	0,0	
Q10	K442	C	2105	0	0,0	0	0,0	
		U	2106	7	2,4	0	0,0	
G11	G443	U	2107	9	3,1	2	3,2	
		C	2108	2	0,7	0	0,0	
K12	R444	C	2109	1	0,3	0	0,0	
		U	2110	282	98,3	62	98,4	
A13	P445	A	2111	103	35,9	17	27,0	
		C	2112	3	1,0	3	4,8	→ C2112G=Q10E
R14	G446	A	2113	1	0,3	0	0,0	
		A	2114	6	2,1	4	6,3	
E15	N447	G	2115	63	22,0	18	28,6	
		G	2116	1	0,3	1	1,6	
F16	F448	G	2117	3	1,0	0	0,0	
		A	2118	205	71,4	43	68,3	
S17	L449	A	2119	0	0,0	0	0,0	
		G	2120	0	0,0	0	0,0	
S18		G	2121	3	1,0	0	0,0	
		C	2122	0	0,0	0	0,0	
		C	2123	0	0,0	0	0,0	
		A	2124	59	20,6	9	14,3	
		G	2125	0	0,0	0	0,0	
		G	2126	1	0,3	0	0,0	
		G	2127	153	53,3	23	36,5	
		A	2128	0	0,0	0	0,0	
		A	2129	0	0,0	0	0,0	
		U	2130	62	21,6	14	22,2	
		U	2131	0	0,0	0	0,0	
		U	2132	0	0,0	0	0,0	
		U	2133	71	24,7	18	28,6	
		C	2134	9	3,1	3	4,8	
		U	2135	191	66,6	33	52,4	→ U2135A=L449H
		U	2136	51	17,8	15	23,8	
		C	2137	0	0,0	0	0,0	

**Tabelle 9: Vergleich der Nukleotidaustausche im p1-Bereich zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten des Subtypengruppe non-B sowie deren Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.** Die vier Spalten links in der Tabelle geben die HxB2-Sequenzen wieder (Aminosäuresequenzen des Pol- und Gag-Leserahmens und Nukleotidsequenz mit den Positionen im HxB2-Referenzstammgenom). Die beiden großen Spalten in der Mitte spiegeln die Verteilung der Nukleotidaustausche im Vergleich zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten der non-B Subtypen wieder. Angegeben ist die Anzahl der Änderungen an der jeweiligen Position im Vergleich zu HxB2. Rechts von der Tabelle sind die signifikanten Änderungen der Nukleotide, sowie die dadurch entstehenden Aminosäureänderungen angegeben.

#### 4.3.3 Insertionen und Deletionen im p1-Frameshiftbereich

Bei der Untersuchung der p1-Region wurden neben einigen Polymorphismen außerdem auch Insertionen bei 15 Isolaten und eine Deletion bei einem Isolat beobachtet. Von den 15 Isolaten mit Insertionen waren neun aus der Subtyp-B- und sechs aus der non-B-Gruppe, elf therapie-naive und vier therapie-erfahrene Isolate. Das Isolat mit einer Deletion in diesem Bereich konnte dem Subtyp B der therapie-naiven Gruppe mit primären Mutationen in der reversen Transkriptase zugeordnet werden.

Die Insertionen von drei Basen wurden an zwei Positionen gefunden, entweder zwischen den Nukleotiden 2111 und 2112 oder 2114 und 2115. Es zeigten sich jeweils drei verschiedene Arten von Insertionen, zwischen den Nukleotiden 2111 und 2112: AAA, CAG und UAU und zwischen den Nukleotiden 2114 und 2115: AGG, GGG und CAC.

#### 4.4 Bestimmung der Frameshifffizienz der p1-Bereiche der HI-Viren von therapie-naiven und therapie-erfahrenen Patienten

Aufgrund der Ergebnisse der Nukleotidsequenzanalyse, die sowohl eine hohe Variabilität der p1-Region als auch signifikante Unterschiede zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten, auch außerhalb der Schnittstellen, gezeigt haben, wurden von ausgewählten Isolaten p1-Frameshiftanalysen durchgeführt. Erhöhte Frameshiftraten könnten ein Mechanismus der Resistenz darstellen, indem mehr Pol-Enzyme gebildet werden, so dass der, für die Unterdrückung der Replikation nötige, Medikamentenspiegel an Inhibitoren nicht mehr ausreichen würde. Um dies zu untersuchen, wurden die entsprechenden p1-Bereiche zwischen die *Renilla*- und *Firefly*-Luziferase in einen Dual-Luziferase-Vektor kloniert und nach Transfektion humaner Zellen die Expressionsraten der beiden Luziferasen bestimmt. Die Translation der *Firefly*-Luziferase konnte nur dann erfolgen, wenn ein Frameshiftereignis stattgefunden hat.

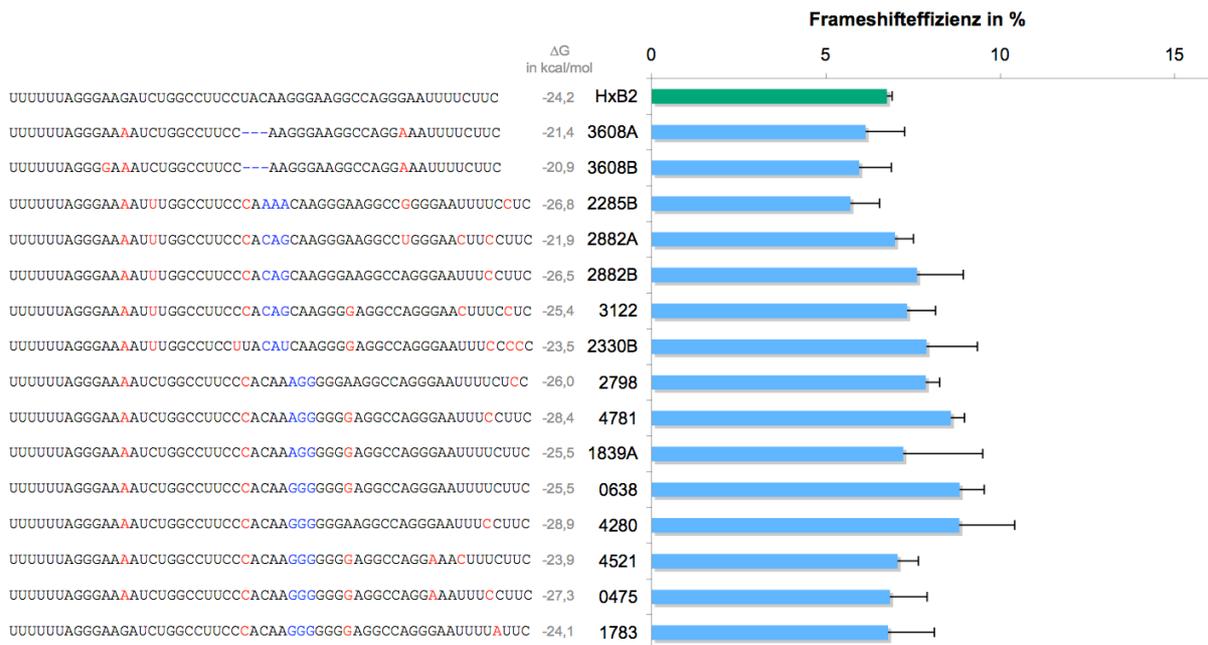
Es wurden insgesamt 73 p1-Konstrukte von 49 therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten mit primären PR-Mutationen sowie 3 Isolate von therapie-erfahrenen Patienten mit Resistenzmutationen in der reversen Transkriptase auf ihre Frameshifffizienz getestet. Des

Weiteren wurde auch die Hairpin-Struktur, eine Sekundärstruktur auf RNA-Ebene, die für den effizienten Frameshift verantwortlich ist, bei den untersuchten Sequenzen mit Hilfe des Programms RNAfold aus dem Vienna package analysiert. Dieses Programm sagt Sekundärstrukturen von RNA-Sequenzen anhand von verschiedenen Algorithmen durch Energieminimierung voraus.

Ein großer Teil der untersuchten Konstrukte zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Frameshifffizienz im Vergleich zu der p1-Sequenz von HxB2 (6,74%). Die Frameshiffraten dieser p1-Sequenzen lagen zwischen 4,8 und 8,8%. Aufgrund der Klonierung konnten von einigen HIV-Isolaten mehrere Sequenzen getestet werden, wobei manche als Minderheit nicht in der Populationssequenzierung detektiert werden konnten.

#### 4.4.1 Insertionen und Deletion

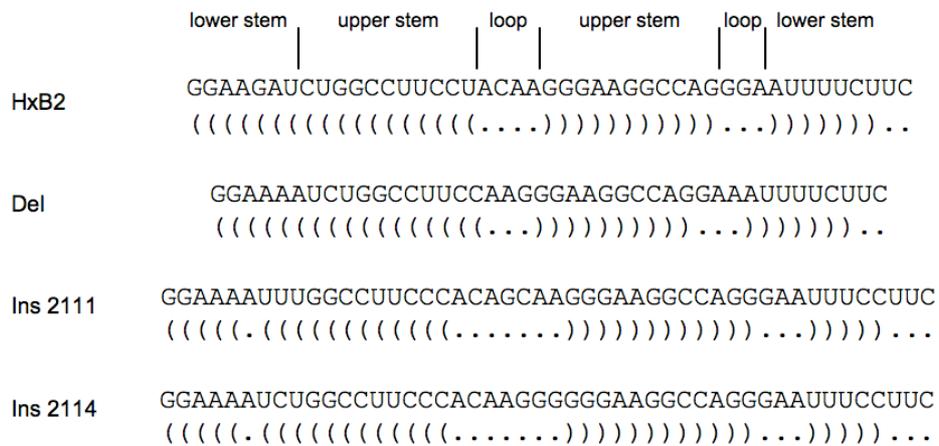
Die bereits beschriebenen Insertionen sowie die Deletion wiesen Frameshifffizienzen zwischen 5,69 und 8,82% auf (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Frameshifffizienzen der Konstrukte mit Deletion bzw. Insertionen.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die Deletion bzw. Insertionen in blau markiert sind und die anderen polymorphen Nukleotide in rot. Die Frameshiffraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen ΔG-Werte sind in grau angegeben.

Bemerkenswert war jedoch die Analyse der vorhergesagten RNA-Strukturen (Abbildung 13). Trotz der Deletion bzw. Insertionen, unabhängig der Position, blieb die Grundstruktur des vorhergesagten Hairpins gleich. Bei den Insertionen wurde der obere Loop vergrößert und bei der Deletion wurde, auch bei Fehlen von 3 Basen, trotzdem ein Loop vorhergesagt. Die freie Enthalpie ΔG der von RNA-fold vorhergesagten Hairpin-Strukturen dieser Isolate

variierte zwischen 20,9 und 28,9 kcal/mol und konnte nicht mit den gemessenen Frameshiftraten korreliert werden.

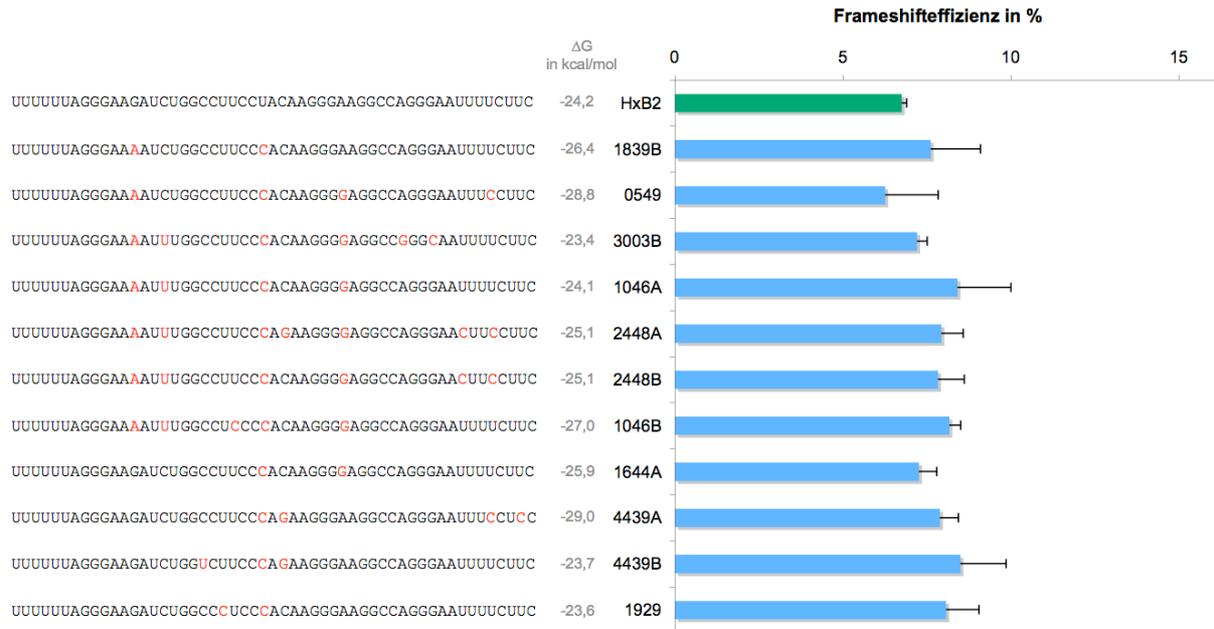


**Abbildung 13: Vorhersage der RNA-Strukturen der Sequenzen mit Deletion bzw. Insertionen.** Bei den Insertionen sind Beispielsequenzen der zwei Insertionspositionen angegeben. Die Klammern geben die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden an, die mit Punkten gekennzeichneten Nukleotide gehen keine solchen Bindungen ein.

#### 4.4.2 Polymorphismen

Die unterschiedlichen, auch bei der Nukleotidsequenz beobachteten, Polymorphismen in der p1-Region zeigten ebenfalls keine signifikanten Erhöhungen oder Absenkungen in den Frameshiftraten (Abbildung 14). Die verschiedenen Kombinationen dieser Polymorphismen in den Isolaten hatten keine größeren Auswirkungen auf die Frameshifteffizienz.

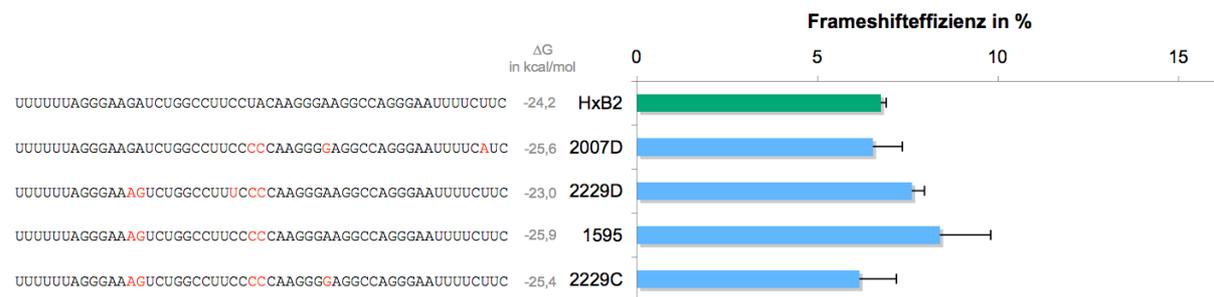
Die Frameshifteffizienzen dieser p1-Sequenzen lagen zwischen 6,25 und 8,49% und die entsprechenden freien Enthalpiewerte zwischen -23,4 und 29,0 kcal/mol. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen den Frameshiftraten und  $\Delta G$ -Werten hergestellt werden.



**Abbildung 14: Frameshifffizienzen der Konstrukte mit unterschiedlichen Polymorphismen sowie deren Kombinationen.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die polymorphen Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshiffraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen ΔG-Werte sind in grau angegeben.

#### 4.4.3 Signifikante Veränderungen außerhalb der Schnittstellen

Die beiden Nukleotidänderungen C2108U und A2111C, die bei der Nukleotidanalyse als therapie-assoziiert, jedoch außerhalb der Schnittstellen, aufgefallen sind, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Frameshifffizienz im Vergleich zum Referenzstamm HxB2 (Abbildung 15). Sowohl die Frameshiffraten, die zwischen 6,15 und 8,38% lagen, als auch die ΔG-Werte zwischen -23,0 und -25,9 wiesen keine Auffälligkeiten auf.

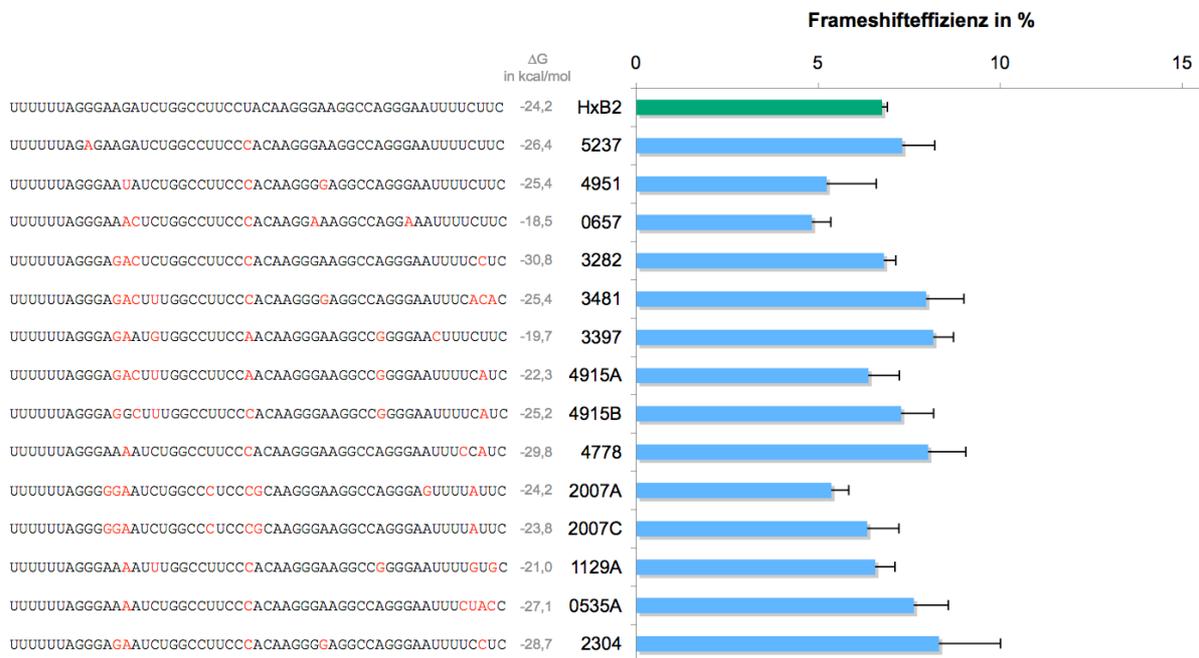


**Abbildung 15: Frameshifffizienzen der Konstrukte mit den Aminosäureänderungen S440F und Y441P.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die veränderten Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshiffraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen ΔG-Werte sind in grau angegeben.

#### 4.4.4 Schnittstellenmutationen

Die Auswirkung der unterschiedlichen Schnittstellenmutationen, die gleichzeitig im p1-Frameshiftbereich liegen, auf die Frameshifffizienz wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 16).

Es wurden Isolate mit folgenden CS-Mutationen auf ihre Frameshifffizienz getestet: therapie-assoziierte Mutationen G435E, K436R, L449H/V und Mutationen K436G/N, I437L/M und L449I/Y. Einige Isolate wiesen auch Kombinationen dieser Aminosäureänderungen auf. Keine dieser p1-Regionen zeigte eine signifikante Änderung in der Frameshiffrate verglichen mit dem Wildtyp, die Messwerte lagen zwischen 4,82 und 8,30%. Auch hier zeigten die freien Enthalpienwerte keinen Einfluss auf die gemessenen Frameshifffizienzen.



**Abbildung 16: Frameshifffizienzen der Konstrukte mit unterschiedlichen CS-Mutationen.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die veränderten Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshiffraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen ΔG-Werte sind in grau angegeben.

#### 4.4.5 Seltene Mutationen

Einige der im Frameshift getesteten Isolate zeigten jedoch signifikante Unterschiede zu HxB2 ( $p < 0,01$ ; Abbildung 17). Den größten Einfluss hatten Nukleotidaustausche innerhalb der slippery site. Bei diesen p1-Sequenzen sank die Frameshiftrate bis auf 0,59 bis 2,53%. Vier dieser fünf Konstrukte wurden nur als Minorität in der Virenpopulation jeweiliger Patienten bei der Klonierung der p1-Region gefunden. In einem Fall wurde die beeinträchtigte slippery site schon bei der Direktsequenzierung entdeckt, jedoch auch als minore Population.

Weitere drei p1-Sequenzen sanken in ihrer Frameshiftrate signifikant ab, auch wenn sie keine zerstörte slippery site aufwiesen ( $p < 0,01$ ). Hier sanken die Werte der Frameshifteffizienzen bis auf 2,15 % (Abbildung 17: Konstrukte 4404, 2285A und 4227A). Auffällig in diesen Sequenzen waren die seltenen Mutationen W438C bei 2285A, W438R bei 4227A sowie eine komplett veränderte Sequenz des oberen Loops bei 4404 (ACAA  $\Rightarrow$  GUGG).

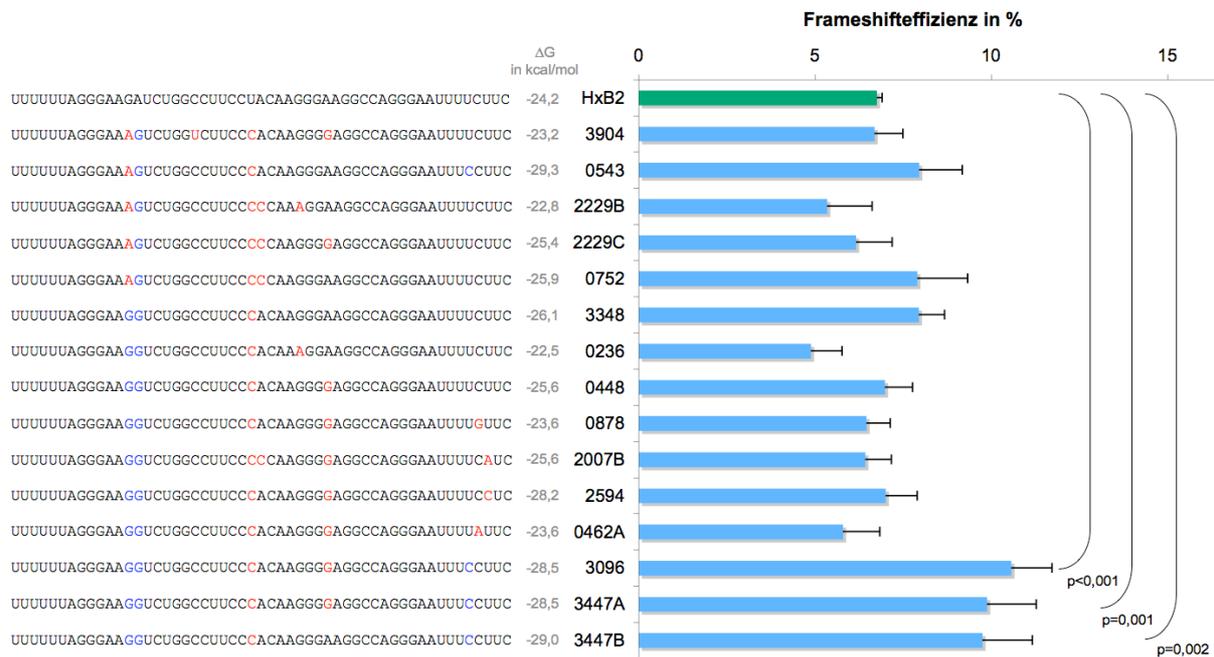
Die von RNA-fold berechneten  $\Delta G$ -Werte hatten auch hier keinen Zusammenhang mit den gemessenen Frameshiftraten gezeigt.



**Abbildung 17: Frameshifteffizienzen der Konstrukte mit seltenen Mutationen.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die veränderten Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshiftraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifteffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen  $\Delta G$ -Werte sind in grau angegeben.

#### 4.4.6 Therapie-assoziierte Schnittstellenmutation I437V

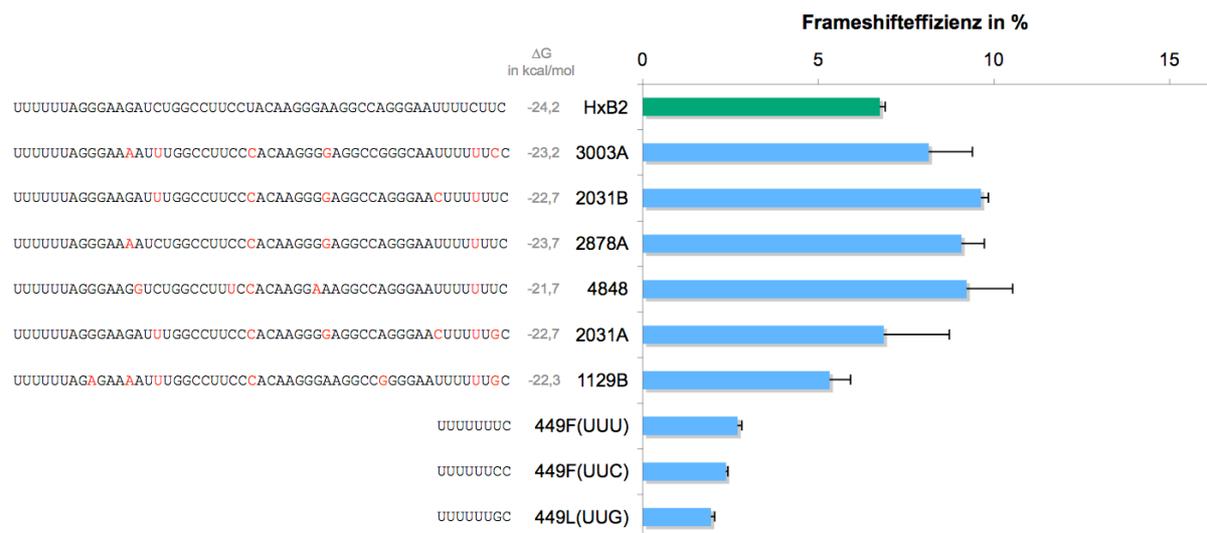
Signifikante Erhöhungen in der Frameshifttrate lieferte die Schnittstellenmutation I437V, jedoch nur in Kombination mit dem Polymorphismus U2133C und dem Wildtypnukleotid an der Position G2097 ( $p < 0,01$ ; Abbildung 18, Isolate 3096, 3447A und 3447B). Sequenzen mit I437V alleine, sowie in Kombination mit nur einer dieser Voraussetzungen zeigten keine signifikant erhöhten Frameshiftraten. Bemerkenswert war, dass diese Kombination nur bei 8 von 89 Isolaten mit einer I437V zu finden war, wobei vier dieser Isolate therapie-naiv und vier therapie-erfahren waren.



**Abbildung 18: Frameshifffeffizienzen der Konstrukte mit I437V.** Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die veränderten Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshifttraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffeffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen  $\Delta G$ -Werte sind in grau angegeben.

#### 4.4.7 Therapie-assoziierte Schnittstellenmutation L449F

Ebenfalls signifikante Erhöhungen der Frameshifffizienz zeigten die p1-Sequenzen mit der Schnittstellenmutation L449F, welche zur Entstehung einer zweiten slippery site in diesem Bereich führt ( $p < 0,05$ ; Abbildung 19). Sie wiesen deutlich höhere Werte in der Frameshifffrate auf als HxB2 (8,13-9,62% vs. 6,74%). Schon die Analyse der 2. slippery site allein in einem Konstrukt, das per *in vitro* Mutagenese hergestellt wurde, brachte eine zwar niedrige, jedoch eindeutig messbare Frameshifffizienz hervor (Abbildung 19, Konstrukt 449F(UUU)). Auffallend war, dass ein G an der Position U2136 einen negativen Einfluss auf die Frameshifffizienz hatte (Abbildung 19, Isolate 2031A und 1129B). Dies zeigte sich auch in der Untersuchung der 2. slippery site ohne eine mögliche nachfolgende Hairpinstruktur (Abbildung 19, 449L(UUG)). Das Isolat mit einem C an dieser Position (L449F, UUC) zeigte im Vergleich zu den anderen Isolaten (L449F, UUU) eine nicht signifikant, jedoch niedrigere Frameshifffizienz. (Abbildung 19, Isolat 3003A).



**Abbildung 19: Frameshifffizienzen der Konstrukte mit L449F.** Die unteren drei Konstrukte stammen im Gegensatz zu den anderen aus einer *in vitro* Mutagenese, diese enthalten außer der slippery site keine nachfolgende Sequenz, die eine Hairpinstruktur bilden könnte. Links sind die entsprechenden p1-Sequenzen abgebildet, wobei die veränderten Nukleotide in rot hervorgehoben sind. Die Frameshifffraten sind in % angegeben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken in grün gibt die Frameshifffizienz von HxB2 wieder. Die dazugehörigen  $\Delta G$ -Werte sind in grau angegeben.

#### 4.5 Bestimmung der *in vitro* Replikationskompetenz ausgewählter Isolate

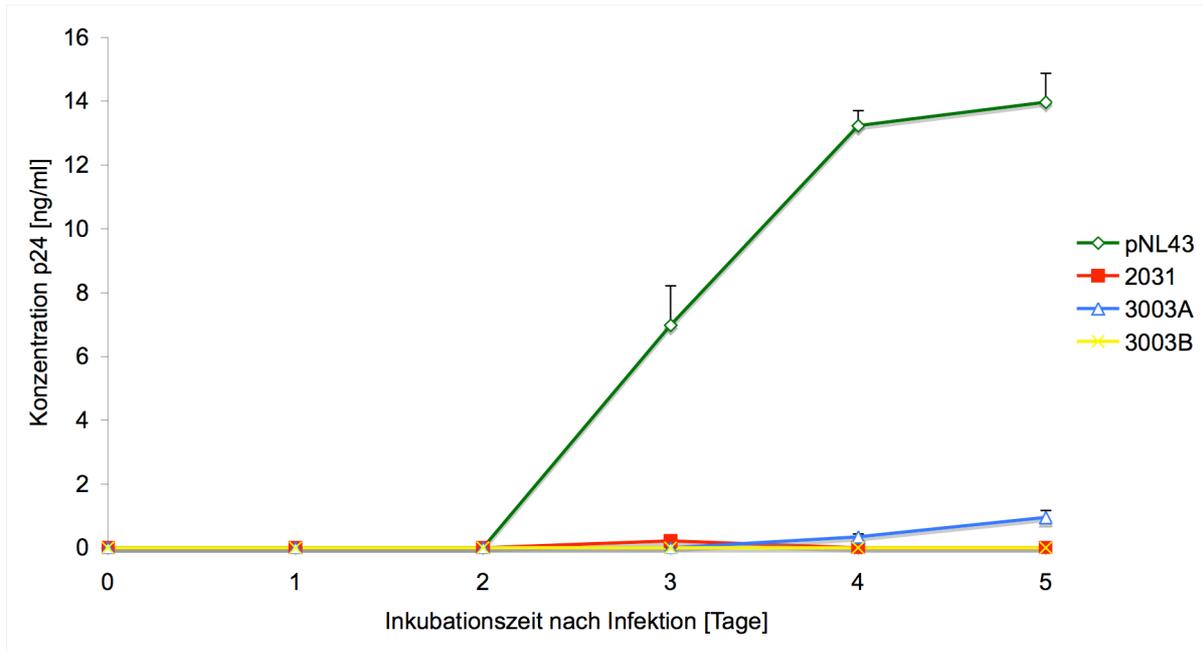
Die CS-Mutation L449F wurde unter antiretroviraler Therapie selektioniert und führte, bedingt durch eine zweite slippery-site, zu einer erhöhten Frameshifffizienz. In PI-resistenten HIV-Isolaten fand sich eine Koevolution dieser Schnittstellenmutation zusammen mit PR-Mutationen, wobei es unklar ist, welche Bedeutung diese Mutation für die Virusreplikation ohne den Druck einer antiretroviralen Therapie hat.

Von den über 900 untersuchten therapie-naiven HIV-Isolaten fand sich nur in zwei Fällen die CS-Mutation L449F in Abwesenheit von primären resistenz-assoziierten PR-Mutationen (Tabelle 10). Die Bedeutung von L449F im Zusammenhang mit einer unveränderten Protease, sowie eine mögliche kompensatorische Funktion der erhöhten Frameshifffizienz sollte anhand von *in vitro* Replikationskinetiken dieser beiden HIV-Isolate untersucht werden.

Isolat	p1-Sequenz	PR-Mutationen
2031	UUUUUUAGGGAAGAUUUGGCCUUCCACAAGGGGAGGCCAGGGAACUUUUUUC	V3I, <b>L10I</b> , <b>I62V</b> , L63I, <b>I93L</b>
3003A	UUUUUUAGGGAAAAUUUGGCCUUCCACAAGGGGAGGCCGGGCAUUUUUUC	V3I, <b>L10I</b> , <b>I13V</b> , L19I, E35D, S37N, R41K, K43R, R57K, <b>L63P</b> , C67W
3003B	UUUUUUAGGGAAAAUUUGGCCUUCCACAAGGGGAGGCCGGGCAUUUUUCUUC	V3I, <b>L10I</b> , <b>I13V</b> , L19I, E35D, S37N, R41K, K43R, R57K, <b>L63P</b> , C67W

**Tabelle 10: Übersicht der in der Wachstumskinetik untersuchten Isolate.** Angegeben sind die p1-Sequenzen, sowie die PR-Mutationen. Sekundäre PR-Mutationen sind hervorgehoben.

Hierfür wurden die C-terminale Gag-Region und die N-terminale Pol-Region mit den kodierenden Bereichen für Protease und reverse Transkriptase dieser Isolate in einen Expressionsvektor mit einer pNL-4.3-Basis kloniert. Somit konnten die spezifischen Eigenschaften der Isolatsequenzen in einem genetisch identischen Hintergrund gemessen werden. Die hergestellten, infektiösen HI-Viren dieser Isolate wurden in einer Wachstumskinetik miteinander sowie mit dem Wildtyp verglichen. Aufgrund der Klonierung war es möglich, zwei unterschiedliche Klone vom Isolat 3003 zu untersuchen (Tabelle 10).



**Abbildung 20: Wachstumskinetik der therapie-naiven Isolate mit der therapie-assoziierten CS-Mutation L449F.** Im Vergleich zu den untersuchten Isolaten ist in grün die Wachstumskurve des pNL-4.3-Wildtypvirus dargestellt. Tag 0 stellt die p24-Konzentration der infizierten Kultur nach Auswaschen des Inokulums dar. Doppelbestimmung.

Im Verlauf der Wachstumskinetik konnte im Überstand der Zellen, die mit den rekombinanten Viren der Isolate 2031 und 3003B infiziert waren, keine Virusreplikation nachgewiesen werden (Abbildung 20). Die Zunahme der p24-Konzentration im Überstand der Zellkultur, die mit dem rekombinanten Virus des Isolats 3003A infiziert war, erfolgte mit deutlicher Verzögerung im Vergleich zum Wildtyp. Die infektiösen Titer aller drei Proben waren bei der Virusanzucht zwar niedriger als der des Wildtypvirus, zeigten jedoch eine eindeutige Virusreplikation (TCID<sub>50</sub>/ml: wt – 3,74x10<sup>6</sup>; 2031 – 6,08x10<sup>4</sup>; 3003A – 1,38x10<sup>5</sup>; 3003B – 8x10<sup>4</sup>).

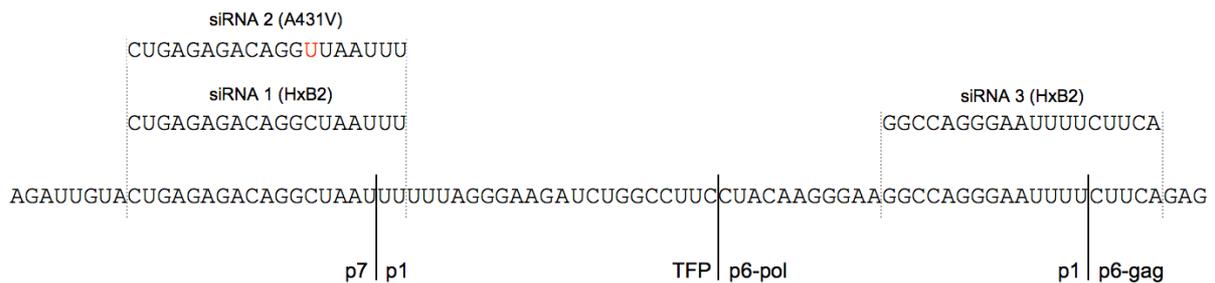
Die untersuchten Isolate besaßen keine primären, jedoch jeweils drei sekundäre Resistenzmutationen in der Protease (Tabelle 10). Im Hinblick auf mögliche kompensatorische Mutationen in Gag außerhalb der klonierten Bereiche zeigte die Sequenzierung der gesamten Gag-Region außerhalb des klonierten Bereichs eine Vielzahl an Mutationen im Vergleich zu HxB2 (Tabelle 11).

Isolat	Mutationen in Gag
2031	H124S, N126S, I138L, A146P, V215L, H219Q, I223V, M228I, G248A, N252H, E260D, T348S, N372S, N385D, I389T, E398V, T401I
3003	H124S, N126R, I147L, V159I, S173T, E203D, T204V, V215L, V218A, H219Q, I223V, E230D, N252S, R275K, T280V, Y301F, S310T, K331R, E345D, G357S, V370A, A374N, T375V, I376A, R384K, N385G, Q386P, V390I, T401I, R403K, N404H

**Tabelle 11: Mutationen der untersuchten Isolate in der Gag-Region außerhalb des klonierten Bereichs.**

## 4.7 Untersuchung der Wirksamkeit von siRNA in der C-terminalen gag-Region

Die virale Replikation kann durch spezifische siRNA inhibiert werden. Um zu untersuchen, inwiefern sich der C-terminale gag-Bereich mit den vier Schnittstellen als Angriffsziel durch siRNA eignet, wurden mit Hilfe eines siRNA-Designprogramms zwei siRNA erstellt, eine mit der Zielsequenz innerhalb der Schnittstelle p7/p1 und eine innerhalb der Schnittstelle p1/p6-gag (Abbildung 21, siRNA 1 und 3), wobei diese Schnittstelle als siRNA-Target eher ungeeignet ist. Sie ist Teil des unteren Hairpins und ist somit an der Ausbildung einer RNA-Sekundärstruktur beteiligt, die eine Anlagerung der siRNA erschwert. Aufgrund der hohen Prävalenz der therapie-assoziierten CS-Mutation A431V – sie kam bei über einem Drittel der therapie-erfahrenen Isolate vor – wurde auch eine siRNA erstellt, die sich an einer Konsensussequenz mit A431V orientiert (Abbildung 21, siRNA 2). Die hier untersuchten HIV-Isolate enthielten häufige Veränderungen, die in den verschiedenen Gruppen gefunden wurden.

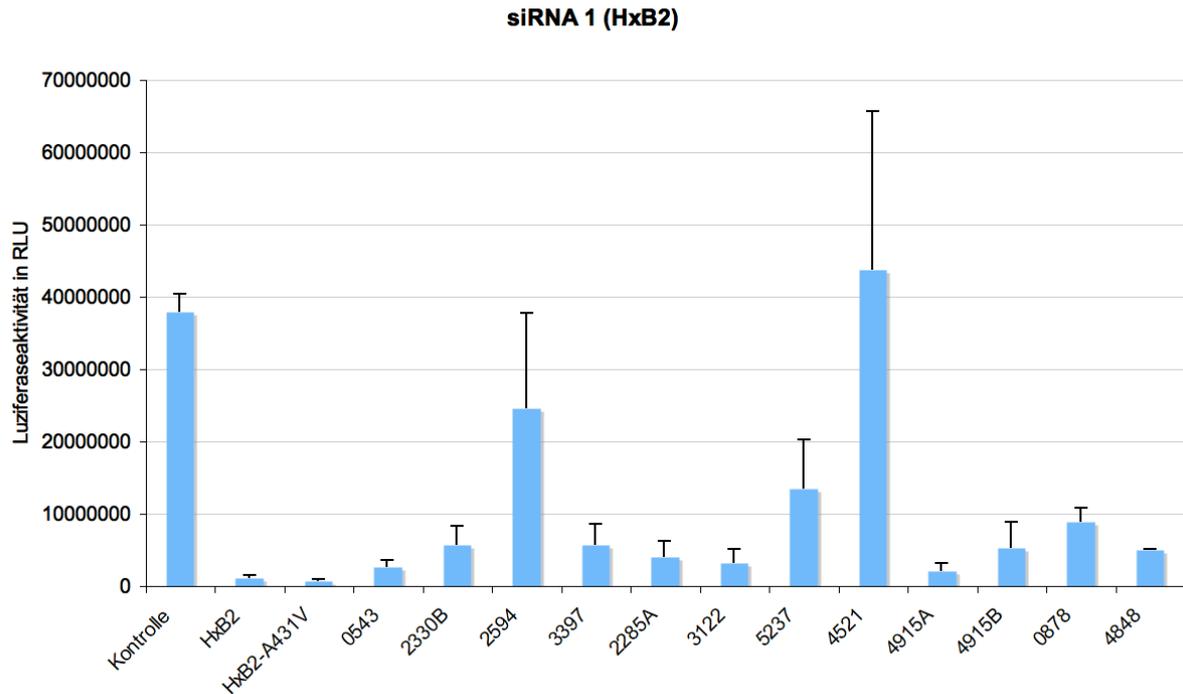


**Abbildung 21: Zielregionen der getesteten siRNA.** Links sind die beiden siRNA mit und ohne die CS-Mutation A431V dargestellt. Unterhalb sind Schnittstellen in diesem Bereich eingezeichnet.

Die Transfektion der Plasmide mit siRNA 1 gegen HxB2 zeigte eine deutliche Herunterregulierung bei fast allen Isolaten mit einer Ausnahme (Abbildung 22). Die Luziferaseaktivität von zehn HIV-Isolaten konnte mit dieser siRNA bis unter 50% inhibiert werden. Bei acht der Isolate konnte die Luziferaseexpression mit dieser siRNA sogar bis unter 20% herunterreguliert werden.

Das Isolat 4521, welches sich nicht in der Luziferaseexpression inhibieren ließ, hatte als einziges eine Veränderung an Position 11 gegenüber der eingesetzten siRNA. Die drei Isolate, die nicht unter 20% herunterreguliert wurden, zeigten Veränderungen an den Positionen 8, 14 und 15, die bei den anderen nicht zu finden waren (Abbildung 22, Isolate 2594, 5237 und 0878).

Veränderungen an Positionen 1, 2, 4, 5 und 13, sowie deren Kombinationen, hatten keinen Einfluß auf die Inhibition der Luziferaseaktivität durch diese siRNA.

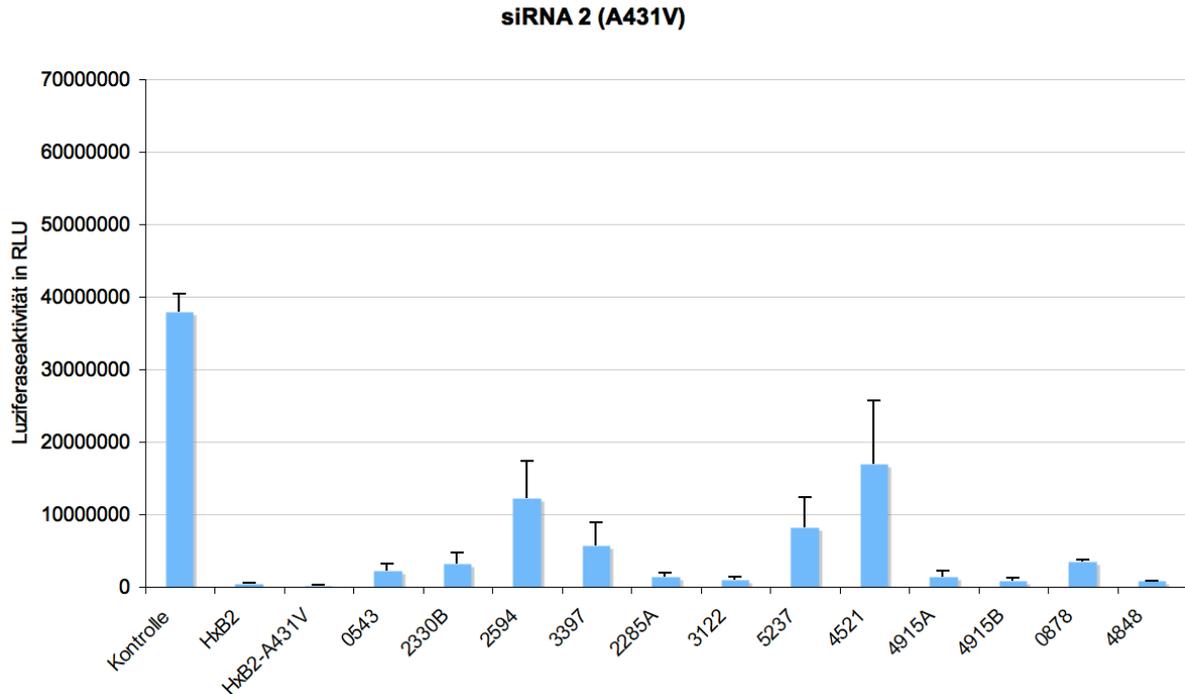


Plasmid	siRNA 1 CUGAGAGACAGGCUAAUUU	Positionen	Anzahl
HxB2	CUGAGAGACAGGCUAAUUU	+	0
HxB2-A431V	CUGAGAGACAGGUUAAUUU	13U	1
0543	CUGAAAGACAGGCUAAUUU	5A	1
2330B	CUGAUAGACAGGCUAAUUU	5U	1
2594	CUGAAAGGCAGGCUAAUUU	5A, 8G	2
3397	UUGAAAGACAGGCUAAUUU	1U, 5A	2
2285A	CGGAGAGACAGGCUAAUUU	2G	1
3122	CCGAGAGACAGGCUAAUUU	2C	1
5237	AUGAGAGACAGGCUCAUUU	1A, 15C	2
4521	CUGAAAGACAAGCUAAUUU	5A, 11A	2
4915A	CUGAAAGACAGGCUAAUUU	5A	1
4915B	CUGAAAGACAGGUUAAUUU	5A, 13U	2
0878	CUGAGAGACAGGCCAAUUU	14C	1
4848	CUGGGAGACAGGCUAAUUU	4G	1

**Abbildung 22: Inhibition der Luziferaseaktivität in Anwesenheit von HIV-1 spezifischer siRNA.** Dargestellt die Luziferaseaktivitäten in RLU der getesteten Plasmide in Anwesenheit der siRNA 1, die der Sequenz von HxB2 entspricht, im Vergleich zum HxB2-Plasmid mit einer Nonsense-siRNA (Kontrolle). Dreifachbestimmung. Die Tabelle enthält die Sequenzen der getesteten Plasmide, in rot sind die Nukleotide gekennzeichnet, die sich von der siRNA unterscheiden. Die beiden Spalten rechts geben an welche Positionen innerhalb der Zielsequenz verändert sind, sowie deren Anzahl.

Die siRNA 2 mit der therapie-assoziierten CS-Mutation A431V zeigte ähnliche Ergebnisse (Abbildung 23). Auch hier konnte die Expression der Luziferase unterdrückt werden, wobei die Luziferaseaktivität der beiden Isolate 2594 und 4521 bei dieser siRNA-Variation, wie auch bei siRNA 1, am wenigsten inhibierbar waren.

Veränderungen an den gleichen Positionen (8, 11, 14, und 15) wie schon beim Einsatz der siRNA 1, zeigten eine reduzierte Inhibition der Luziferaseaktivität.



Plasmid	siRNA 2	Positionen	Anzahl
	CUGAGAGACAGGUAAUUU		
HxB2	CUGAGAGACAGGCUAAUUU	13C	1
HxB2-A431V	CUGAGAGACAGGUAAUUU	+	0
0543	CUGAAAGACAGGCUAAUUU	5A, 13C	2
2330B	CUGAUAGACAGGCUAAUUU	5U, 13C	2
2594	CUGAAAGGCAGGCUAAUUU	5A, 8G, 13C	3
3397	UUGAAAGACAGGCUAAUUU	1U, 5A, 13C	3
2285A	CGGAGAGACAGGCUAAUUU	2G, 13C	2
3122	CCGAGAGACAGGCUAAUUU	2C, 13C	2
5237	AUGAGAGACAGGCUCAUUU	1A, 13C, 15C	3
4521	CUGAAAGACAAGCUAAUUU	5A, 11A, 13C	3
4915A	CUGAAAGACAGGCUAAUUU	5A, 13C	2
4915B	CUGAAAGACAGGUAAUUU	5A	1
0878	CUGAGAGACAGGCCAAUUU	13C, 14C	2
4848	CUGGGAGACAGGCUAAUUU	4G, 13C	2

**Abbildung 23: Inhibition der Luziferaseaktivität in Anwesenheit von HIV-1 spezifischer siRNA.** Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten in RLU der getesteten Plasmide in Anwesenheit der siRNA 2, die der Sequenz von HxB2 mit der CS-Mutation A431V entspricht, im Vergleich zum HxB2-Plasmid mit einer Nonsense-siRNA (Kontrolle). Dreifachbestimmung. Die Tabelle enthält die Sequenzen der getesteten Plasmide, in rot sind die Nukleotide gekennzeichnet, die sich von der siRNA unterscheiden. Die beiden Spalten rechts geben an welche Positionen innerhalb der Zielsequenz verändert sind, sowie deren Anzahl.

Bemerkenswert war, dass selbst mit einer höheren Anzahl an veränderten Positionen eine Inhibition der Luziferaseexpression stattgefunden hat.

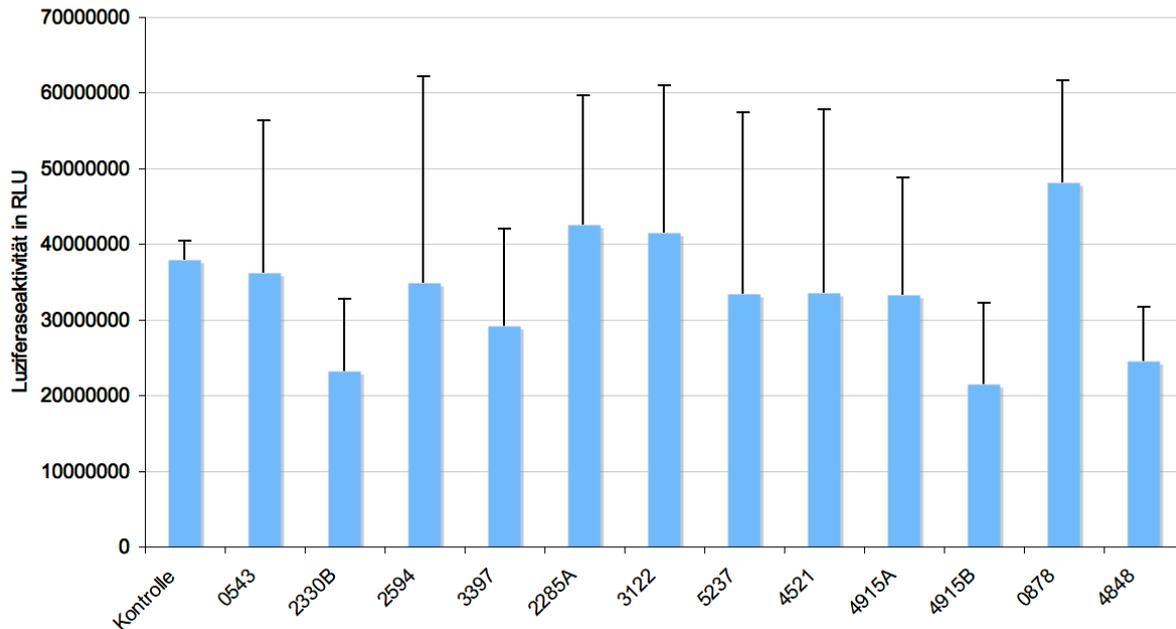
Die Schnittstellenmutation A431V in der Sequenz von HxB2 bzw. in der Sequenz der siRNA hatte keinen Einfluß auf die Wirksamkeit der siRNA-Inhibition.

Die Untersuchung des Kollektivs der 1409 Isolate zeigte, dass fast 90% der HI-Viren mit diesen siRNA in ihrer Replikation inhibiert werden können. 10,4% der Sequenzen hatten

Veränderungen an mindestens einer der kritischen Positionen (8, 11, 14 und 15). Auch der Anteil der Isolate mit Mutationen an mindestens einer dieser Positionen bei den Subtypengruppen, sowie bei therapie-naiven und therapie-erfahrenen war gleich (Subtyp B: 9,4% vs. non-B: 13%; TN: 10,7% vs. TE: 9%).

Die Zielsequenz der siRNA 3 lag in der Schnittstelle p1/p6-gag, im Bereich des Hairpins. Hier konnte keine relevante Inhibition der Luziferaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 24).

**siRNA 3 (HxB2)**



Plasmid	siRNA 3	Positionen	Anzahl
	GGCCAGGGAAUUUUCUUCA		
0543	GGCCAGGGAAUUU <u>C</u> CUUCA	14C	1
2330B	GGCCAGGGAAUUU <u>CCCC</u> CA	14C, 16C, 17C	3
2594	GGCCAGGGAAUUU <u>C</u> CUUCA	16C	1
3397	GGCC <u>GGG</u> GA <u>C</u> UUUUCUUCA	5G, 11C	2
2285A	GGCC <u>GGG</u> GAUUU <u>C</u> CUUCA	5G, 16C	2
3122	GGCCAGGGAA <u>C</u> UUU <u>C</u> CUUCA	11C, 16C	2
5237	GGCCAGGGAAUUUUCUUCA	-	0
4521	GGCCAGG <u>AA</u> <u>C</u> UUUUCUUCA	8A, 11C	2
4915A	GGCC <u>GGG</u> GAUUU <u>A</u> UCA	5G, 16A	2
4915B	GGCC <u>GGG</u> GAUUU <u>A</u> UCA	5G, 16A	2
0878	GGCCAGGGAAUUU <u>G</u> UUCA	15G	1
4848	GGCCAGGGAAUUU <u>U</u> UCA	15U	1

**Abbildung 24: Inhibition der Luziferaseaktivität in Anwesenheit von HIV-1 spezifischer siRNA.** Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten in RLU der getesteten Plasmide in Anwesenheit der siRNA 3, die der Sequenz von HxB2 entspricht, im Vergleich zum HxB2-Plasmid mit einer Nonsense-siRNA (Kontrolle). Dreifachbestimmung. Die Tabelle enthält die Sequenzen der getesteten Plasmide, in rot sind die Nukleotide gekennzeichnet, die sich von der siRNA unterscheiden. Die beiden Spalten rechts geben an welche Positionen innerhalb der Zielsequenz verändert sind, sowie deren Anzahl. Die Inhibition von HxB2 wurde nicht eigens untersucht, da in diesem Fall die Sequenz von HxB2 mit dem Isolat 5237 identisch ist.

## 5 Diskussion

Das HI-Virus unterliegt einem ständigen Druck von Seiten des Immunsystems des infizierten Patienten, der zur Selektion verschiedenster Anpassungsformen führen kann. Die hohe Variabilität von HIV, bedingt durch die fehlende proof-reading Funktion der reversen Transkriptase, bewirkt eine enorme Diversität zwischen HIV-Stämmen ein und desselben Patienten aus Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden. Bei Patienten, die eine antiretrovirale Therapie erhalten, wird der hauptsächliche Selektionsdruck nicht mehr durch das Immunsystem, sondern durch die verabreichten Medikamente ausgeübt. Bezüglich der Entwicklung des HI-Virus unter diesem Druck wurden bisher hauptsächlich die Zielregionen dieser Inhibitoren untersucht. Die Anpassung des Virus kann jedoch auch auf andere Weise erfolgen. In dieser Arbeit wurde der Genbereich näher untersucht, der die spezifische Aminosäuresequenz für vier Schnittstellen der viralen Protease in zwei Leserahmen codiert, und darüber hinaus auf RNA-Ebene verantwortlich für ein Frameshiftereignis ist, welches die Entstehung der viralen Proteine ermöglicht. Es sollte geklärt werden, welche Möglichkeiten der Anpassung HIV in diesem Bereich hat, der verschiedenste Funktionen in der Virusreplikation beeinflusst.

### 5.1 Veränderungen der C-terminalen gag- und N-terminalen pol-Schnittstellen der Protease in HI-Viren von therapie-naiven und -erfahrenen Patienten

Der in dieser Arbeit untersuchte Bereich enthält vier Schnittstellen der Protease und alle vier wiesen unterschiedlich häufig vorkommende Mutationen auf. Die Häufigkeiten unterschieden sich sowohl zwischen den Subtypengruppen B und non-B als auch zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen Isolaten. Als therapie-assoziiert wurden diejenigen Mutationen definiert, die bei therapie-erfahrenen Isolaten mit mindestens einer primären PR-Resistenzmutation signifikant häufiger vorkamen. Mutationen, die eine homogene Verteilung zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen HIV-Isolaten und eine Prävalenz von mehr als 1% aufwiesen, wurden als Polymorphismen bezeichnet. Die Polymorphismen unterschieden sich zwischen den Subtypengruppen und nahmen, wie später näher erläutert wird, auch Einfluß auf die Art der entstehenden therapie-assoziierten Mutationen.

Einige der therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen wie A431V, L449F und P453L wurden bereits kurz nach der Einführung der Proteaseinhibitoren *in vivo* in Virenpopulationen von HIV-infizierten Patienten bzw. in *in vitro* Selektionsversuchen beobachtet (Doyon *et al.*, 1996; Bally *et al.*, 2000; Gatanaga *et al.*, 2002). Andere therapie-assoziierte Schnittstellenmutationen variierten bisher von Studie zu Studie, hauptsächlich wegen der sehr heterogenen Patientenkollektive, so dass deren Bedeutung hinsichtlich der Evolution der PI-

Resistenz nicht klar erfasst werden konnte. Im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen wurde in dieser Arbeit ein größeres Kollektiv an therapie-naiven und therapie-erfahrenen Patientenisolaten untersucht und es konnten sowohl bereits diskutierte als auch neue Schnittstellenmutationen als therapie-assoziiert identifiziert werden.

Die bedeutendste Gag-Schnittstellenmutation in dem untersuchten Patientenkollektiv war A431V. Abgesehen von dem signifikant häufigeren Vorkommen bei therapie-erfahrenen Isolaten, war sie die häufigste therapie-assoziierte Mutation bei Isolaten des Subtyps B (38,3%). Eine signifikante Akkumulation bei therapie-erfahrenen Isolaten und eine ähnlich hohe Prävalenz dieser Schnittstellenmutation, jedoch in sehr viel kleineren Kollektiven, wurden auch von anderen Gruppen beschrieben (Bally *et al.*, 2000: 17/75 (23%); Gallego *et al.*, 2003: 14/82 (17,1%)). Diese Schnittstellenmutation wurde sowohl in *in vitro* Selektionsversuchen mit Amprenavir (Gatanaga *et al.*, 2002), Lopinavir (Carrillo *et al.*, 1998), Ritonavir (Mammano *et al.*, 1998) und einigen neuen PI (Doyon *et al.*, 1996; Croteau *et al.*, 1997; Afonina *et al.*, 2007) beobachtet, als auch bei PI-resistenten HIV-Isolaten von Patienten, die mit Darunavir oder Tipranavir behandelt wurden (Tremblay *et al.*, 2007; Lambert-Niclot *et al.*, 2008). In Verbindung mit einer resistenten Protease zeigten Viren mit einer A431V eine erhöhte Replikationskapazität (Quercia *et al.*, 2008). Die Schnittstellenmutation A431V konnte mit mehreren primären Resistenzmutationen in der Protease korreliert werden, so dass eine gemeinsame Evolution von Enzym und Substrat offensichtlich wird. Die Assoziation mit der PR-Mutation V82A wird z.B. durch Strukturanalysen von Prabu-Jeyabalan *et al.* bestätigt (Prabu-Jeyabalan *et al.*, 2006). Sie konnten zeigen, dass in der Protease mit einer V82A eine bessere Bindung mit der p7/p1-Schnittstelle mit A431V hergestellt werden kann als mit der Wildtyp-Aminosäure an dieser Position. Auch *in vivo* wurden Korrelationen der A431V mit verschiedenen primären PR-Mutationen beobachtet (Bally *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2005; Valer *et al.*, 2005; Kolli *et al.*, 2008). So wurde sie häufig, wie auch in dieser Arbeit, in Isolaten gleichzeitig mit den Mutationen L76V und M46I/L in der Protease vorgefunden. Nijhuis *et al.* konnten einen alternativen Resistenzpfad aufzeigen, in dem die Schnittstellenmutation A431V zuerst und nachfolgend M46I und L76V in der Protease während der Resistenzentwicklung gegenüber Lopinavir im Virusgenom eines HIV-Infizierten selektiert wurden (Nijhuis *et al.*, 2007c). Auch Lambert-Niclot *et al.* stellten eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von A431V in Gag und einer nachfolgenden Selektion von L76V in der Protease fest (Lambert-Niclot *et al.*, 2008). Die Untersuchung der Assoziation dieser therapie-assoziierten Mutation mit primären Resistenzmutationen in der Protease zeigte auch negative Korrelationen. Besonders auffällig war das seltenere Vorkommen von A431V in HIV-Isolaten mit den PR-Mutationen D30N und N88D, welches auch von Kolli *et al.* beobachtet wurde (Kolli *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass die PR-Mutationen V82A und D30N nie simultan in einem Isolat vorkommen (Hoffman *et al.*,

2003) unterstützt diese Beobachtungen. Eine nicht ganz so offensichtliche negative Korrelation mit L90M wurde bisher einzig in dieser Arbeit beobachtet, wobei diese aber auch einen signifikanten Unterschied zwischen 55,6% und 68% widerspiegelt. Dies ist am wahrscheinlichsten auf die unterschiedlichen Resistenzprofile zurückzuführen, da L90M vorwiegend bei ungeboosterten PI eine primäre PR-Mutation ist, jedoch bei geboosterten PI nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, dann aber besonders PR-Mutationen I54V, V82A und I84V wichtig sind, die signifikant mit A431V korreliert werden konnten. Proteaseinhibitoren, die die Schnittstellenmutation A431V selektieren, stellen unter diesem Aspekt keinen entscheidenden Selektionsfaktor für L90M dar.

Interessant ist, dass Viren mit A431V und einer Wildtyp-Protease im Vergleich zur Protease mit primären Resistenzmutationen in ihrer Replikationskapazität etwas eingeschränkt sind (Myint *et al.*, 2004). Dies erklärt das seltene Vorkommen dieser Schnittstellenmutation in therapie-naiven Isolaten (5/644 (0,8%)) und die Assoziation von A431V mit primären PR-Mutationen in therapie-naiven Isolaten. Diese beiden Beobachtungen zusammen mit der völligen Abwesenheit dieser Schnittstellenmutation bei HIV-Isolaten, die vor 1995 von HIV-infizierten Patienten gewonnen werden konnten, geben wichtige Hinweise auf den möglichen Entstehungshintergrund dieser Schnittstellenmutation bei therapie-naiven Isolaten. Es kann spekuliert werden, dass A431V in therapie-naiven Isolaten nicht aufgrund einer natürlichen Sequenzvariabilität auftritt, sondern als Ausdruck einer Infektion mit einem PI-resistenten Stamm, bei dem die Schnittstellenmutation auch ohne den Selektionsdruck einer PI-Therapie verbleibt. Die signifikante Korrelation mit resistenz-assoziierten Mutationen in der RT in therapie-naiven Isolaten deutet ebenfalls auf eine ehemalige PI-Exposition dieser Isolate hin, welche durch die eindeutige frühere RTI-Exposition noch wahrscheinlicher ist.

Im Widerspruch zu der eingeschränkten Replikationskapazität steht die erhöhte Prozessierungsrate der p7/p1-Schnittstelle mit A431V auch durch die Wildtyp-Protease. Dies konnte anhand von Hydrolysekinetiken gezeigt werden (Fehér *et al.*, 2002; Nijhuis *et al.*, 2007b). Die Prozessierung dieser Schnittstelle stellt einen limitierenden Schritt während der Reifung dar (Zhang *et al.*, 1997; Pettit *et al.*, 1998; Dauber *et al.*, 2002). Sobald jedoch der Druck durch die Medikamente ausgeübt wird, kann diese Mutation bereits alleine, ohne Mutationen in der Protease, Resistenz vermitteln. Diesen neuen Mechanismus in der Evolution der Resistenz hat die Gruppe um Monique Nijhuis anhand von *in vitro* Selektionsversuchen aufgezeigt (Nijhuis *et al.*, 2007b). Gestützt wird diese Beobachtung von Dam *et al.* (Dam *et al.*, 2009). Diese Arbeitsgruppe stellte anhand von rekombinanten Viren mit Gag-Pol-Sequenzen aus Patientenisolaten fest, dass die Reversion von A431V zur Wildtyp-Aminosäure einen 2- bis 5-fach niedrigeren Resistenzfaktor zur Folge hatte. Von einer Erhöhung des Resistenzfaktors und der viralen Fitness der Viren mit einer PI-resistenten Protease und der Schnittstellenmutation A431V wurde schon mehrmals berichtet (Parkin *et*

*al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2008; Quercia *et al.*, 2008; Dam *et al.*, 2009). Das therapie-assoziierte Vorkommen dieser Mutation, die enge Verbindung mit primären Resistenzmutationen in der Protease, sowie ihre hohe Prävalenz, verdeutlichen die große Bedeutung dieser Region bei der Resistenzentwicklung von HIV.

Die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation I437V wurde signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten des Subtyps B beobachtet. Dies konnten auch andere Gruppen zeigen (Tremblay *et al.*, 2007; Garcia-Diaz *et al.*, 2008; Dam *et al.*, 2009). Eine Selektion dieser CS-Mutation im Zusammenhang mit einer veränderten Protease wurde in dieser Arbeit auch anhand von signifikanten Korrelationen mit primären Resistenzmutationen in der Protease gezeigt. Eine Assoziation mit V82A wurde auch von Lastere *et al.* beobachtet (Lastere *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu Lambert-Niclot *et al.*, die einen Zusammenhang zwischen L76V in der Protease und I437V in p7/p1 festgestellt haben (Lambert-Niclot *et al.*, 2008), konnte in dieser Untersuchung keine Korrelation dieser beiden Mutationen beobachtet werden. Eine eindeutige Erhöhung der Replikationskapazität wurde nur im Zusammenhang mit einer resistenten Protease mit den Mutationen G48V, I54V und V82A festgestellt (Dam *et al.*, 2007). Diese wurden auch hier in einer signifikanten Assoziation mit der CS-Mutation I437V beobachtet. Dies spricht für eine kompensatorische Funktion der Schnittstellenmutation im Hinblick auf die eingeschränkte Replikationsfähigkeit des HI-Virus mit einer beeinträchtigten Protease. Dass eine therapie-assoziierte Schnittstellenmutation jedoch gleichzeitig kompensatorisch und resistenzvermittelnd sein kann, wies die gleiche Arbeitsgruppe nach (Dam *et al.*, 2007). Viren mit einer I437V ohne primäre Resistenzmutationen in der Protease zeigten im Mittel eine 2,8-fach erhöhte Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren im Vergleich zu Wildtyp-Viren. Ähnliche Resistenzfaktoren wurden auch von Nijhuis *et al.* beobachtet (Nijhuis *et al.*, 2007b).

Im Unterschied zur A431V (0,8%) in derselben Schnittstelle kam diese Mutation mit einer Prävalenz von 3,1% bei therapie-naiven Isolaten vor. Im Moment ist es unklar, ob die Prävalenz der I437V bei therapie-naiven Isolaten aufgrund unspezifischer Entstehung oder einer deutlich häufigeren Persistenz nach Übertragung eines PI-resistenten HIV-Isolats zustande kommt. Immerhin ist I437V auch mit dem Nachweis einer primären PI-Resistenz korreliert. Die Persistenz von I437V in Abwesenheit von primären Resistenzmutationen in der Protease spricht dafür, dass diese Mutation einen deutlich geringeren negativen Effekt, als z.B. A431V, für das therapie-naive Virus zur Folge hat. Tatsächlich scheint diese CS-Mutation nur einen moderaten Effekt auf die Replikationskapazität in einem Wildtypintergrund auszuüben (Quercia *et al.*, 2008). Ungeachtet des Ursprungs muss in weiteren Studien geklärt werden, ob die gemessene phänotypische Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren von HIV mit I437V die genetische Barriere der ersten Therapie beeinflussen und eventuell ein frühes Therapieversagen begünstigen kann.

Da ein und dieselbe Nukleotidmutation zur CS-Mutation I437V in Gag und den beiden CS-Mutationen D05S/G in Pol führt, kann im Moment eine zusätzliche Selektion in der Pol-Schnittstelle TFP/p6-pol nicht ausgeschlossen werden. Bisher wurden die Veränderungen in Pol bei der Beschreibung von Therapieanpassungen in diesem Bereich nicht berücksichtigt. Eine eventuell eigenständige Bedeutung dieser Mutationen wird durch die assoziierten unterschiedlichen Resistenzprofile der beiden Mutationen D05G und D05S weiter wahrscheinlich, da D05G nur mit V82A in der Protease assoziiert war und D05S in ihrem Assoziationsprofil I437V sehr ähnlich war, abgesehen von V82A und einer zusätzlichen Korrelation mit V82T. Die Beziehung dieser beiden Schnittstellen mit der PI-resistenten Protease muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden und könnte eventuell hilfreich sein für die bisher sehr unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der I437V.

Die in der Gruppe der non-B Subtypen als therapie-assoziiert identifizierte CS-Mutation K436R wurde mehrfach bei therapie-erfahrenen Isolaten beobachtet (Kolli *et al.*, 2007; Nijhuis *et al.*, 2007a). Die Bedeutung dieser Schnittstellenmutation wird jedoch vorrangig in der Selektion durch das Immunsystem gesehen (Honeyborne *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2009; Semeniuk *et al.*, 2009). Sie befindet sich in einem Epitop, das von zytotoxischen T-Lymphozyten von HLA-B\*13-positiven Individuen erkannt wird. Die Unterschiede in der Prävalenz von HLA-B\*13-Genotypen bei unterschiedlicher ethnischer Abstammung (Europa: 5% vs. Taiwan: 20%) könnte zu dem signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von K436R zwischen Subtyp B und non-B beitragen (B: 6,5% vs. non-B: 17,1%). Assoziationen mit primären Resistenzmutationen in der Protease konnten in Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt werden. Auch Kolli *et al.* konnten eine signifikante Erhöhung dieser Schnittstellenmutation bei therapie-erfahrenen Isolaten mit einer V82A in der Protease beobachten (Kolli *et al.*, 2007). Eine 1,3- bis 2,3-fach reduzierte Suszeptibilität gegenüber allen Proteaseinhibitoren bei Viren mit dieser CS-Mutation zusammen mit der resistenz-assoziierten PR-Mutation L90M wurde von der gleichen Gruppe festgestellt (Kolli *et al.*, 2008). So entgehen Viren mit dieser Mutation nicht nur der Erkennung durch das Immunsystem HLA-B\*13-positiver Patienten, sondern erreichen auch in Verbindung mit PR-Mutationen eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren.

Eine der interessantesten Positionen in Gag, die mit einer PI-Therapie assoziiert sind, ist die L449. Mutationen an dieser Position wurden schon früh nach der Einführung von PR-Inhibitoren im Zusammenhang mit einer Therapie beobachtet, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Croteau *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Bally *et al.*, 2000; Gatanaga *et al.*, 2002). Meistens, wie auch in dieser Arbeit, war es die Veränderung L449F, die signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten des Subtyps B vorkam, wenn auch mit 3% nicht so häufig wie hier (8,3%) (Bally *et al.*, 2000; Malet *et al.*, 2007). Die Mutation L449V wurde bisher nur einmal erwähnt (Kohli *et al.*, 2007), jedoch auch im Zusammenhang mit einer PI-Therapie. *In*

*in vitro* Daten sowie in dieser Arbeit gefundene Assoziationen mit primären PR-Mutationen stützen die Vermutung, dass die L449F-Mutation eine beeinträchtigte Protease kompensiert. Fehér *et al.* konnten zeigen, dass die Schnittstelle p1/p6-gag mit L449F eine verbesserte Kinetik sowohl bei Wildtyp- als auch bei PI-resistenter Protease aufzeigte (Fehér *et al.*, 2002). Die signifikante Assoziation von L449F und den Proteasemutationen D30N und N88D wird von Kolli *et al.* bestätigt. Diese Gruppe fand neben der gleichen signifikanten Assoziation dieser Mutationen heraus, dass D30N mit der Aminosäureposition 449 mehr Bindungen eingeht als mit entsprechender Position bei anderen Schnittstellen bzw. Substraten (Kolli *et al.*, 2006). Dies erklärt die Koevolution dieser Mutationen. Außerdem wurde festgestellt, dass das Substrat p1/p6-gag mit Phenylalanin an dieser Position von einer Protease mit den Mutationen D30N und N88D aufgrund der erhöhten Anzahl an van der Waals Kräften besser gebunden wird, im Vergleich zu Wildtyp-Substraten mit einem Leucin. Maguire *et al.* konnten eine verbesserte Fitness und eine reduzierte Sensitivität gegenüber einem Proteaseinhibitor bei Viren mit dieser Mutation beobachten, jedoch nur mit primären Resistenzmutationen in der Protease (Maguire *et al.*, 2002). Eine Erhöhung der phänotypischen Resistenz gegenüber zwei unterschiedlichen Proteaseinhibitoren aufgrund dieser Schnittstellenmutation wurde auch in einer Untersuchung von Prado gezeigt (Prado *et al.*, 2002).

Eine interessante Tatsache zeigte sich beim Vergleich der Mutationen an dieser Position zwischen den Subtypen. In der Gruppe der non-B-Subtypen war es die Aminosäureänderung L449H, die signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten vorkam. Bei der genauen Betrachtung wurde deutlich, dass die Entstehung dieser Mutation durch die hohe Prävalenz des Polymorphismus L449P in Isolaten der non-B-Subtypen diktiert wird (B: 7,5% vs. non-B: 66,2%). Eine Veränderung von L449P (CCU) zu L449F (UUU) würde zwei Mutationsschritte erfordern, während der Schritt von der Aminosäure P (CCU) zur Aminosäure H (CAU) in nur einem Nukleotidaustausch besteht. Bemerkenswert ist auch, dass die Aminosäuren Histidin und Phenylalanin beide aromatisch sind, so dass ein gemeinsamer funktioneller Aspekt der L449F und L449H bei der Virusreplikation unter dem Selektionsdruck von PI angenommen werden kann. Dieses Beispiel veranschaulicht am besten die Bedeutung der unterschiedlichen Polymorphismen zwischen Subtyp B und non-B-Subtypen. Diese geben die Anzahl und die Art der Veränderungen vor, die erzielt werden müssen, um bestimmte Aminosäuremutationen an derselben Position zu erreichen. Sie beeinflussen somit die Art der selektierten therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen. Ähnlich wurde dies auch für die Selektion von V82M in der Protease bei Subtyp G beschrieben (Camacho *et al.*, 2005). Während an der Position 82 bei Subtyp B und entstehender PI-Resistenz V zu A mutiert, findet bei Subtyp G ein Austausch von I nach M häufiger statt. Es zeigt sich, dass die

Kenntnis der natürlichen Polymorphismen bei der Untersuchung therapie-assoziiertes Mutationen sehr hilfreich ist.

Die therapie-assoziierte Mutation P453L ist nach A431V die häufigste Mutation, die im Zusammenhang mit einer PI-Therapie beobachtet wurde, *in vivo* und *in vitro* (Côté *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 2003; Valer *et al.*, 2005; Afonina *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Bally *et al.*, die diese Mutation aufgrund der relativ hohen Prävalenz bei therapie-naiven Isolaten als natürlichen Polymorphismus bezeichneten (Bally *et al.*, 2000), wurde diese Schnittstellenmutation in dieser Arbeit eindeutig als therapie-assoziiert identifiziert. Jedoch scheint P453L in Kombination mit L449P einen deutlich stärkeren polymorphen Charakter zu haben als beim isolierten Vorkommen. P453L findet sich auch in Kombination mit L449P in verschiedenen Konsensussequenzen der non-B Subtypen A und C, so dass auch hier P453L deutlich häufiger bei non-B Isolaten gefunden wurde als beim HIV Subtyp B. Bally *et al.* konnten bei Isolaten mit dieser Mutation eine positive Korrelation mit der Proteasemutation I84V und eine negative mit V82A aufzeigen, ähnlich den hier beschriebenen Ergebnissen. Eine Assoziation mit M46L (Maguire *et al.*, 2002), konnte hier nicht bestätigt werden, dafür wurde sie signifikant häufiger bei Isolaten mit M46I in der Protease beobachtet. Abgesehen von eindeutigen Assoziationen mit primären Resistenzmutationen in der Protease konnte für diese Schnittstellenmutation sowohl eine erhöhte Replikationskapazität als auch erhöhte Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren nachgewiesen werden (Maguire *et al.*, 2002; Parkin *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005; Afonina *et al.*, 2008).

Die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation G435E wurde bisher nicht *in vivo* in therapie-erfahrenen Isolaten beobachtet. In einem *in vitro* Evolutionsexperiment wurde diese Mutation bei rekombinanten Viren selektiert, die aus Isolaten von HI-infizierten und PI-behandelten Patienten hergestellt werden konnten (van Maarseveen *et al.*, 2007). Auch die Schnittstellenmutation E428D konnte von anderen Gruppen nicht in Patientenisolaten beobachtet werden. Sie wurde bisher nur in Selektionsversuchen mit neuen PI, Darunavir und Lopinavir, selektiert (Afonina *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit war sie jedoch nicht nur signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten zu finden, sie konnte auch mit einigen primären Resistenzmutationen in der Protease assoziiert werden (I47A, I54A, V82F). Die Schnittstellenmutationen S451G in p1/p6-gag und Q10E in TFP/p6-pol konnten hier erstmals als eindeutig therapie-assoziiert identifiziert werden. Deren Bedeutung für Replikation sowie Resistenz muss noch weiter geklärt werden. Die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation R452S wurde unabhängig von zwei Gruppen bei Isolaten beobachtet, die kein virologisches Ansprechen auf PI-Therapien mit Darunavir bzw. Tipranavir gezeigt haben (Dierynck *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2007). Auch die Schnittstellenmutation S451T, die in dieser Arbeit signifikant häufiger bei therapie-erfahrenen Isolaten beobachtet wurde, wurde

bei Isolaten vorgefunden, die sich gegenüber einer Therapie mit Darunavir als resistent gezeigt haben (Dierynck *et al.*, 2007). Abgesehen von P453L wurden an der Position 453 zwei weitere Mutationen beobachtet, P453A und P453V. Sie wurden bisher nur von einer Gruppe beschrieben, jedoch, wie auch hier, nur bei therapie-erfahrenen Isolaten (Bally *et al.*, 2000).

Insgesamt zeigt sich eine Vielzahl von Anpassungen innerhalb der untersuchten Schnittstellen, die eng mit resistenz-assoziierten PR-Mutationen korreliert sind, jedoch deutlich mehr in den Gag- als in den Pol-Schnittstellen. Es wird somit deutlich, dass bei der PI-Resistenz neben den Mutationen innerhalb des Enzyms auch Mutationen innerhalb des Substrats wichtig sind. Die Bedeutung der gefundenen Schnittstellenmutationen kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da keine phänotypische Resistenz der analysierten HIV-Isolate bestimmt wurde. Ein spätes Auftreten der Schnittstellenmutationen während der Evolution der PI-Resistenz würde besonders für einen kompensatorischen Charakter der Mutationen sprechen, einen eigenen Effekt auf die Medikamentenwirksamkeit aber auch nicht ausschließen. Auch von Proteasemutationen ist bekannt, dass es Veränderungen gibt, die entweder hauptsächlich die Medikamentenbindung beeinflussen oder kompensatorisch die eingeschränkte enzymatische Aktivität wieder ausgleichen, und welche, die beides bewirken können. Seit der Erstbeschreibung eines Resistenzmechanismus gegenüber Proteaseinhibitoren basierend alleine auf Schnittstellenveränderungen, bedingt durch eine höhere Präferenz des Substrats für die Bindung an das aktive Zentrum der Protease, wurde von verschiedenen Gruppen die direkte resistenzvermittelnde Funktion von Gag-Schnittstellenmutationen nachgewiesen. Da aber ein Therapieversagen bei einem Patienten nur durch ein Virus verursacht werden kann, das gegenüber den verabreichten Medikamenten nicht nur resistent ist, sondern auch replizieren kann, scheint eine Betrachtung der PI-Resistenz ohne die Berücksichtigung von Schnittstellenmutationen nicht adäquat zu sein. Der nächste Schritt müsste die Berücksichtigung von Schnittstellenmutationen bei der HIV-Resistenztestung sein, besonders für die genotypische Vorhersage der Wirksamkeit von Proteaseinhibitoren, die ohne die Analyse von Schnittstellenmutationen den Grad der Anpassung des untersuchten HIV-Isolates leicht unterschätzen kann. Neben der Bedeutung der Schnittstellenmutationen für ein Therapieversagen wird zukünftig auch der Nachweis dieser Veränderungen bei therapie-naiven Isolaten klinische Relevanz erlangen, da diese Schnittstellenmutationen entweder direkt die Wirksamkeit von Proteaseinhibitoren herabsetzen, die Entstehung der Resistenz begünstigen oder aber ein Hinweis auf die Übertragung eines noch resistenteren Virus sind, das zu einem vorzeitigen Versagen der ersten antiretroviralen Therapie führen könnte.

## 5.2 Untersuchung des Frameshiftbereichs von HIV-Isolaten therapie-naiver und therapie-erfahrener Patienten und Analyse der Frameshifffizienz

Als weiterer Mechanismus der Resistenz, basierend auf Veränderungen außerhalb der direkten Zielproteine der antiretroviralen Medikamente, wurde immer wieder die Erhöhung der Frameshifffizienz diskutiert. Der dadurch hervorgerufene Anstieg in der Menge der viralen Proteine aus dem Pol-Vorläuferprotein im Viruspartikel würde zu einer Unwirksamkeit der Medikamente führen, die nur eine festgelegte Konzentration in den virusinfizierten Zellen erreichen können. Mutationen, die z.B. die Stabilität der Haarnadelstruktur erhöhen (Telenti *et al.*, 2002) oder eine zweite slippery site schaffen (Doyon *et al.*, 1998) und damit zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für dieses Ereignis führen, könnten die Ursache dafür sein. Besonders bedeutend ist in diesem Zusammenhang, dass der zweiten slippery site die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation L449F zugrunde liegt.

Eine Untersuchung dieses Frameshiftbereichs zeigte, trotz des Vorliegens einer hochkonservierten Region, äußerst viel Variabilität. Sowohl die Nukleotidsequenzen als auch die gemessenen Frameshifffizienzen der HIV-Isolate wiesen Unterschiede auf. Vor allem wurde deutlich, dass die Konsensussequenz der untersuchten Viren sich von der Referenzsequenz HxB2 unterscheidet. Dies zeigten die natürlich vorkommenden Polymorphismen durch die hohe Prävalenz sowohl bei therapie-naiven als auch therapie-erfahrenen Isolaten, z.B. G2097A oder U2110C, die bei über 70% bzw. 90% der Isolate beobachtet wurden. Um jedoch eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen als auch der verschiedensten HIV-Subtypen untereinander zu erzielen, wurden Veränderungen in dieser Region bezüglich der allgemein anerkannten Referenzsequenz von HxB2 betrachtet, ähnlich der angewandten Praxis für die Protease und reverse Transkriptase bei der genotypischen HIV-Resistenzbestimmung.

Da der frameshiftregulierende Bereich lediglich aus 52 Nukleotiden besteht, sind besonders Insertionen und Deletionen auffällig. Es wurden Insertionen an zwei verschiedenen Positionen gefunden, die nochmals aufgrund der eingefügten Nukleotide in jeweils drei Untergruppen unterteilt werden konnten. Nichtsdestotrotz, hatten die verschiedenen Insertionen sowie die einzige Deletion, die in diesem Bereich beobachtet werden konnten, keine signifikanten Unterschiede in der Frameshifffizienz zur Folge. Für die häufigste Insertion in diesem Bereich (Position 2114) wurde dies auch von anderen Arbeitsgruppen schon gezeigt (Telenti *et al.*, 2002; Girnary *et al.*, 2007). Sowohl in dieser Arbeit als auch bei der Untersuchung von Telenti lieferte die Strukturvorhersage trotz dieser gravierenden Veränderungen keine Abweichung von der Grundstruktur im Vergleich zum Wildtyp. Bei der vorhergesagten RNA-Struktur finden sich in all diesen Fällen weiterhin zwei Loops und die verschiedenen komplementären RNA-Bereiche, wobei die obere Schleife durch die Insertion

vergrößert wird. Diese Strukturvorhersage wird durch biochemische Strukturanalysen von Girnary *et al.* gestützt (Girnary *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass diese Schleife zusammen mit dem oberen Stamm während des Ereignisses mit dem Ribosom interagiert (Léger *et al.*, 2004; Staple *et al.*, 2005). Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass der größere Loop zu keiner funktionell bedeutenden Verstärkung der Ribosom-RNA-Interaktion bei dem Frameshiftereignis führt.

Obwohl eine Vielzahl an Polymorphismen, subtypabhängig und -unabhängig, in diesem Bereich gefunden wurde, führten keine zu signifikanten Auswirkungen auf die Frameshifffizienz. Ähnliches konnte auch die Gruppe von Telenti beobachten, die die Frameshifffizienz bei verschiedenen HIV-Subtypen untersucht hat (Telenti *et al.*, 2002).

Fünf Positionen mit Mutationen, die zu therapie-assoziierten Schnittstellen-veränderungen führen, liegen im Frameshiftbereich. Weder die therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen (G435E, K436R, L449H/V) noch die natürlich vorkommenden Polymorphismen (I437L, L449P/I) an den Schnittstellen hatten eine Auswirkung auf die gemessene Frameshifffizienz. Sogar die beiden therapie-assoziierten Veränderungen C2108U und A2111C auf Nukleotideebene, die außerhalb der Gag-Schnittstellen lagen und zu keiner Veränderung im Pol-Leserahmen führten, hatten keinen Einfluss auf die Frameshifffizienz. Die Bedeutung dieser Mutationen muss somit in der Gag-Aminosäuresequenz liegen. Bei der Analyse von Veränderungen, die zu einer Unwirksamkeit des neu entwickelten Maturationsinhibitors Bevirimat führen, zeigte sich, dass auch Veränderungen außerhalb von Schnittstellen, aber in enger räumlicher Beziehung zu diesen, unter PI-Therapie selektiert werden und eventuell die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins an den Schnittstellen p24/p2 und p2/p7 beeinflussen (Salzwedel *et al.*, 2008). Dies könnte über eine geänderte Faltung des Gag-Vorläuferproteins in diesem Bereich vermittelt werden, die zu einem erleichterten Zugang der viralen Protease an ihr natürliches Substrat führt. Einen doppelten Vorteil, nicht nur auf Aminosäureebene sondern auch auf RNA-Ebene, scheinen diese Mutationen für das Virus unter dem Selektionsdruck der Medikamente nicht zu bringen.

Eine Reihe von Isolaten zeigte eine deutlich reduzierte Frameshifffizienz bis zu 0,6%. Die reduzierte Frameshiffrate in Verbindung mit einer zerstörten slippery site wurde schon mehrmals beobachtet (Doyon *et al.*, 1998; Girnary *et al.*, 2007). Im Unterschied zu dieser Arbeit wurde dies an Konstrukten gezeigt, die mittels einer zielgerichteten Mutagenese hergestellt wurden. Hier konnten jedoch Viren mit einer unterbrochenen slippery site in der Viruspopulation HIV-infizierter Patienten beobachtet werden. Meistens waren diese in der Populationssequenzierung nicht erkennbar, d.h. sie stammten aus einer Minderheit. Nur in einem Fall war die zerstörte slippery site auch in der Direktsequenzierung erkennbar, aber auch als minore Population. Das Vorhandensein solcher HI-Viren im Plasma sowie die hier gemessene Frameshifffizienz lassen auf eine Produktion von HI-Viren schließen, die nicht

replikationsfähig bzw. in ihrer Replikation extrem eingeschränkt sind. Ähnliches wurde auch von Sanchez-Merino *et al.* beobachtet. Bei einer Mutter-Kind-Transmission wurde beim Kind im Alter von drei Monaten eine Minorität mit solch einer unterbrochenen slippery site detektiert, die bei der Mutter vor der Geburt nicht zu beobachten war. Diese Virusvariante hatte sich jedoch nicht durchgesetzt, wie sich bei einer weiteren Untersuchung nach einem Jahr zeigte (Sanchez-Merino *et al.*, 2005).

Interessant waren die niedrigen Frameshiffraten der Isolate mit den seltenen Mutationen W438C, W438R, sowie mit einem komplett veränderten oberen Loop. Sowohl die Struktur- als auch die Stabilitätsvorhersage, also die Werte für die freie Enthalpie für den Hairpin mit den Mutationen W438C/R zeigten keine Hinweise für die Reduktion der Frameshifffizienz. NMR-spektroskopische Untersuchungen der RNA-Sekundärstrukturen dieser beider Sequenzen könnten einen Aufschluß darüber geben. Die bisherigen Strukturuntersuchungen mit dieser Methode wurden nur ausgehend von der HxB2-Referenzsequenz durchgeführt (Staple *et al.*, 2005). Dahingegen kann der veränderte obere Loop zwar den Hairpin in seiner Stabilität nicht beeinflussen, eventuell aber die Interaktion der RNA mit dem Ribosom. Beim viralen programmierten Frameshift wird immer wieder diskutiert, dass neben der slippery site und der RNA-Sekundärstruktur auch eine direkte Interaktion zwischen der RNA in den Loops des Hairpins und dem Ribosom wichtig ist (Brunelle *et al.*, 1999; Léger *et al.*, 2004). Die Ergebnisse des untersuchten HIV-Isolates deuten daraufhin, dass diese direkte RNA-Ribosom-Interaktion auch bei HIV eine wichtige Komponente für die Frameshifffizienz ist. Ähnliches zeigte die Arbeitsgruppe Léger *et al.* am Beispiel der Seitenschleife. Die vorhergesagten Werte der freien Enthalpie, wie sie oft für die Vorhersage der Stabilität und somit der Frameshifffizienz benutzt werden, ließen sich nicht mit den gemessenen Frameshiffraten korrelieren. Dies traf auch für alle anderen untersuchten Isolate zu. Anscheinend ist nicht nur die Stabilität des Hairpins für die Wahrscheinlichkeit eines Frameshiftereignisses von Bedeutung.

Die therapie-assoziierte Schnittstellenmutation I437V führte in Kombination mit dem Wildtyp-Nukleotid (HxB2) an Position G2097 und dem Polymorphismus U2133C zu einer signifikant erhöhten Frameshiffrate im Vergleich zu HxB2. Da insgesamt nur 8 von 89 Isolaten mit dieser Schnittstellenmutation auch diese zwei Veränderungen gleichzeitig aufwiesen, wobei die Hälfte dieser Isolate therapie-naiv war, zeigte sich keine zusätzliche Selektion der erhöhten Frameshiffrate neben der Selektion der Schnittstellenveränderung. Eine Erhöhung der Frameshifffizienz auf diesem Weg scheint bei resistenten HIV-Isolaten keinen Selektionsvorteil zu bringen.

Ebenfalls eine eindeutige Erhöhung der Frameshifffizienz zeigten HIV-Isolate mit der therapie-assoziierten Schnittstellenmutation L449F, die zu der Entstehung einer zweiten slippery site führen kann. Dies wurde auch von anderen Gruppen anhand von

mutagenisierten Konstrukten gezeigt (Doyon *et al.*, 1998; Girnary *et al.*, 2007). Häufige Polymorphismen rund um L449F, die zu keiner Änderung der Gag-Aminosäuresequenz führen (z.B. U2133C), jedoch Unterbrechungen in der durchgehenden zweiten slippery site verursachen, führten die Frameshift rate auf Wildtyp-Niveau zurück. Dennoch könnte in diesem Fall eine therapie-assoziierte Schnittstellenmutation, die auf Aminosäureebene resistenzvermittelnd agiert, gleichzeitig auch eine Kompensation auf der RNA-Ebene durch eine Erhöhung der Frameshifffizienz bedingen. Immerhin 18 von 23 Isolaten mit L449F zeigten Voraussetzungen für eine erhöhte Frameshifffizienz, jedoch nur zwei von beinahe tausend therapie-naiven Isolaten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Erhöhung der Frameshifffizienz kein genereller Mechanismus der Resistenz ist. Die meisten therapie-assoziierten Veränderungen, ob innerhalb oder außerhalb der Schnittstellen, führten nicht zu einer signifikant erhöhten Frameshifffizienz. Auffallend war auch, dass die Frameshifffizienzen der einzelnen Isolate zwar durchaus variabel waren, sich jedoch nur in einer engen Spannbreite bewegten. So konnte nie eine Erhöhung der Frameshifffizienz über 11% beobachtet werden. Eine Erhöhung der Gag/Gag-Pol-Ratio, bedingt durch die höhere Frameshift rate, kann sich für das Virus auch als nachteilig erweisen. Shehu-Xhilaga *et al.* konnten zeigen, dass bei einer steigenden Ratio an Gag-Pol-Vorläuferproteinen die Infektiosität und Replikationskapazität der HI-Viren sinken (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). Eine Erhöhung der Frameshifffizienz muss auch nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Replikationsfähigkeit beitragen, da auf dem Weg von der Translation zum abgeschnürten Virus noch andere Regulationen stattfinden. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Gag-Vorläuferprotein seine eigene Translation moduliert. Bei einer niedrigen Gag-Konzentration wird die Translation stimuliert und bei einer hohen Konzentration inhibiert (Anderson *et al.*, 2006). Eine Erhöhung der Menge an Gag-Pol-Vorläuferproteinen im Zellplasma führt auch nicht unbedingt zu einer Erhöhung dieser Menge im Virion. Bei der Assemblierung werden diese Vorläuferproteine in Komplexen mit Gag-Vorläufern und genomischer viraler RNA zur Membran transportiert, so dass hier auch eine Kontrolle der Menge an verpackten Proteinen stattfindet (Hill *et al.*, 2005). Außerdem könnte eine Anreicherung von Gag-Pol im Zellplasma zu einer verfrühten Prozessierung führen, die eine Abknospung des Virions unterdrücken würde (Kräusslich, 1991), sowie zu einer verbesserten Erkennung von HLA-Epitopen innerhalb der Pol-Proteine.

### 5.3 Analyse der *in vitro* Replikationskompetenz therapie-naiver HI-Viren mit der therapie-assoziierten Schnittstellenmutation L449F

Die Schnittstellenmutation L449F konnte nicht nur mit erworbener PI-Resistenz korreliert werden, sondern zeigte auch eine Erhöhung der Frameshifttrate. Von den 18 Isolaten, die die Voraussetzungen für eine erhöhte Frameshifffizienz erfüllten, waren zwei therapie-naiv. Um die Bedeutung dieser Veränderung im Zusammenhang mit einer unveränderten Protease, sowie eine mögliche kompensatorische Funktion der erhöhten Frameshifffizienz zu untersuchen, wurden *in vitro* Replikationskinetiken durchgeführt. Die Replikationsfähigkeit der untersuchten rekombinanten Viren im Vergleich zum Referenzstamm NL4.3 war extrem eingeschränkt. Eine bis auf 36% im Vergleich zum Wildtyp reduzierte *in vitro* Replikationskapazität bei Viren mit L449F haben auch Prado *et al.* beobachtet, wobei im Vergleich dazu die Replikationskapazität bei Zugabe von PR-Inhibitoren erhöht war (Prado *et al.*, 2002). Weitere Ursachen für die eingeschränkte Replikationskompetenz könnten entweder in wahrscheinlichen Mutationsereignissen während der Selektion der großen Plasmide liegen oder in kompensatorischen Mutationen innerhalb der N-terminalen Gag-Region, die in diesem Fall nicht aus dem Patientenisolat stammte. Eine eingeschränkte Replikation bei rekombinanten Viren ohne entsprechende N-terminale Gag-Region trotz C-terminaler Schnittstellenmutationen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet (Nijhuis *et al.*, 2006; Parry *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung der kompletten Gag-Region dieser Isolate sind auch die Mutationen N126S, S173T, H219Q, N252S, I389T und T401I aufgefallen, die bereits als kompensatorisch bzw. therapie-assoziiert bekannt sind (Gatanaga *et al.*, 2002; Parry *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2009). Im Zusammenhang mit L449F ist besonders die Gag-Mutation H219Q aufgefallen (Aoki *et al.*, 2009). Rekombinante Viren waren fähig, die eingeschränkte Replikation bedingt durch eine beeinträchtigte Protease nur aufgrund dieser Mutationen wiederherzustellen, L449F allein war dazu nicht in der Lage. Sie erhöhte jedoch die Replikationskapazität der Viren mit vorhandenen N-terminalen Gag-Veränderungen (Aoki *et al.*, 2009). Die untersuchten Patientenisolare könnten durchaus mit der beobachteten progredienten HIV-Infektion in Verbindung gebracht werden und die fehlende Virusreplikation könnte an den mangelnden kompensatorischen Elementen der *in vitro* gemessenen Konstrukte liegen. Die Bedeutung kompensatorischer Elemente in der Virusreplikation wird außerdem unterstrichen durch den Ursprung dieser beiden untersuchten Viren. Beide Viren wiesen eine Gag-Schnittstellenmutation ohne resistenz-assoziierte PR-Mutationen auf, die am wahrscheinlichsten nach Übertragung einer PI-resistenten HIV-Variante in der dominanten Population bestehen geblieben ist. Dieses setzt aber voraus, dass ein Virus, welches unter Medikamentendruck selektiert wurde und replizieren muss, plötzlich nur noch dem Selektionsdruck des Immunsystems des neuen

Wirts ausgesetzt ist und demzufolge neue Anpassungen erfahren muss. Die komplexe Anpassung an die antiretrovirale Therapie kann zu einer kompensatorischen Fixation der erworbenen Mutationsprofile führen, so dass nach dem Wegfall des Medikamentendrucks die Reversion zum Wildtyp unmöglich wird. Es kommt zur Entstehung neuer Mutationen, die eine suffiziente Replikation gewährleisten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Kompensation aufgrund der erhöhten Frameshift-Rate hier nicht gegeben zu sein scheint. Eine Anpassung des in seiner Replikation beeinträchtigten Virus ist außerhalb des klonierten Bereichs anzunehmen. Die Klonierung der gesamten Gag-Region scheint unerlässlich zu sein, um aussagekräftige Replikationskinetiken durchführen zu können. Außerdem wäre auch die Replikationsfähigkeit dieser Isolate unter dem Druck von antiretroviralen Substanzen zu untersuchen.

Wie diese Arbeit gezeigt hat, ist eine Untersuchung des C-terminalen Gag- und N-terminalen Pol-Bereichs von großer Bedeutung. Aufgrund der Überlappung der vier Schnittstellen, deren Veränderung in der Therapie überaus notwendig scheint, mit der frameshiftregulierenden Region, ist die Art der Veränderungen in gewisser Weise eingeschränkt. Dennoch findet das Virus einen Weg, der Vielzahl der Anforderungen an diese Region unter dem Druck der Medikamente und des Immunsystems zu entsprechen, wobei dies in erster Linie über die Anpassung der Schnittstellen erfolgt. Dies wird vor allem durch die hier beobachteten therapie-assoziierten Schnittstellenmutationen ausreichend belegt. Eine evolutionäre Anpassung über die Erhöhung der Frameshifffizienz und der darausfolgenden Erhöhung der Menge der viralen Proteine muss noch in weiteren Replikationsassays, besonders unter dem Druck von antiretroviralen Substanzen, geklärt werden. Eine eventuell erhöhte Frameshift-Rate in einer Umgebung ohne medikamentösen Druck scheint keinen Vorteil gegenüber einem Wildtypvirus zu bringen.

#### **5.4 Wirksamkeit von siRNA in der C-terminalen gag-Region**

Angesichts der bedeutenden therapie-assoziierten Veränderungen innerhalb der vier Schnittstellen im untersuchten Gag-/Pol-Bereich wurden in dieser Arbeit gegen diese Region gerichtete siRNA als Inhibitoren der viralen Replikation untersucht. Es konnten zwei siRNA identifiziert werden, die für eine Inhibition geeignet sind, wobei eine davon gegen therapie-erfahrene HIV-Isolate mit der hochprävalenten Schnittstellenmutation A431V gerichtet war. Der Einsatz der beiden siRNA hatte sowohl bei Isolaten mit als auch ohne diese Schnittstellenmutation eine Inhibition der Luziferaseaktivität zur Folge, so dass eine Berücksichtigung der A431V in der Sequenz dieser siRNA nicht notwendig erscheint. Eine eingehende Untersuchung von 1409 HI-Viren zeigte, dass mit diesen siRNA fast 90% dieser Isolate in ihrer Replikation inhibiert werden könnten. Anhand dieser Ergebnisse konnte auch gezeigt

werden, dass eine gewisse Variabilität der Zielregion bei Inhibition durch siRNA zulässig ist. Die frühere Annahme, dass ein einziger Nukleotidaustausch in der Zielregion den Inhibitions-effekt der siRNA aufhebt (Bass, 2000; Elbashir *et al.*, 2001), scheint längst überholt zu sein. Zu ähnlichen Schlüssen führte neben anderen auch die Untersuchung von Du *et al.*, wobei diese Arbeitsgruppe, im Gegensatz zu dieser Arbeit, keine Kombinationen von Nukleotid-veränderungen untersucht hat, sondern einzelne Austausche (Du *et al.*, 2005).

Da eine Resistenzentwicklung auch beim Einsatz von siRNA stattfindet (Boden *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004), scheint der Einsatz von siRNA sowohl gegen mehrere als auch für die Replikation unerlässliche Bereiche sinnvoll oder aber eine Kombination mit weiteren anti-retroviralen Substanzen, wobei dieser Bereich ein überaus geeignetes Ziel bietet. Tatsächlich befindet sich bereits ein shRNA-basierter Ansatz in einer klinischen Phase I Studie. Da der Einsatz von si- bzw. shRNA häufig zu zytotoxischen Reaktionen führt (Sledz *et al.*, 2004), muss eine Validierung der hier getesteten siRNA noch erfolgen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Afonina E., Gulnik S. V., Eissenstat M., Yokoe H., Yu B., Parkin N. T. and Erickson J. W. *XVI International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007.*
- Afonina E., Markowitz M., Yokoe H., Mohri H., Gulnik S. V. and Erickson J. W. *XVII International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2008.*
- Anderson E. C. and Lever A. M. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol* 2006; 80(21), 10478-86.
- Aoki M., Venzon D. J., Koh Y., Aoki-Ogata H., Miyakawa T., Yoshimura K., Maeda K. and Mitsuya H. Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delay development of resistance to other protease inhibitors. *J Virol* 2009; 83(7), 3059-68.
- Auersperg N. Histogenetic behavior of tumors. I. Morphologic variation in vitro and in vivo of two related human carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43(1), 151-73.
- Bally F., Martinez R., Peters S., Sudre P. and Telenti A. Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16(13), 1209-13.
- Barre-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599), 868-71.
- Bass B. L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 2000; 101(3), 235-8.
- Berkhout B. HIV-1 evolution under pressure of protease inhibitors: climbing the stairs of viral fitness. *J Biomed Sci* 1999; 6(5), 298-305.
- Berkhout B. RNA interference as an antiviral approach: targeting HIV-1. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6(2), 141-5.
- Birnboim H. C. and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7(6), 1513-23.
- Boden D., Pusch O., Lee F., Tucker L. and Ramratnam B. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 2003; 77(21), 11531-5.
- Borman A. M., Paulous S. and Clavel F. Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to protease inhibitors: selection of resistance mutations in the presence and absence of the drug. *J Gen Virol* 1996; 77 ( Pt 3), 419-26.
- Bouamr F., Melillo J. A., Wang M. Q., Nagashima K., de Los Santos M., Rein A. and Goff S. P. PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J Virol* 2003; 77(22), 11882-95.
- Brierley I. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol* 1995; 76 ( Pt 8), 1885-92.

- Brunelle M. N., Payant C., Lemay G. and Brakier-Gingras L. Expression of the human immunodeficiency virus frameshift signal in a bacterial cell-free system: influence of an interaction between the ribosome and a stem-loop structure downstream from the slippery site. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(24), 4783-91.
- Bryant M. and Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(2), 523-7.
- Camacho R., Godinho A. R., Gomes P., Abecasis A., Vandamme A. M., Palma C., Carvalho A. P., Cabanas J. and Goncalves J. *XIV International HIV Drug Resistance Workshop, Québec, Canada, 2005.*
- Carrillo A., Stewart K. D., Sham H. L., Norbeck D. W., Kohlbrenner W. E., Leonard J. M., Kempf D. J. and Molla A. In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor. *J Virol* 1998; 72(9), 7532-41.
- Clavel F. and Hance A. J. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350(10), 1023-35.
- Connor R. I., Mohri H., Cao Y. and Ho D. D. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 1993; 67(4), 1772-7.
- Côté H. C., Brumme Z. L. and Harrigan P. R. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *J Virol* 2001; 75(2), 589-94.
- Croteau G., Doyon L., Thibeault D., McKercher G., Pilote L. and Lamarre D. Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol* 1997; 71(2), 1089-96.
- Dam E., Faudon J. L., Launay O., Duval X., Costagliola D., Descamps D. and Clavel F. *XVI International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007.*
- Dam E., Quercia R., Glass B., Descamps D., Launay O., Duval X., Krausslich H. G., Hance A. J. and Clavel F. Gag mutations strongly contribute to HIV-1 resistance to protease inhibitors in highly drug-experienced patients besides compensating for fitness loss. *PLoS Pathog* 2009; 5(3), e1000345.
- Das A. T., Brummelkamp T. R., Westerhout E. M., Vink M., Madiredjo M., Bernards R. and Berkhout B. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004; 78(5), 2601-5.
- Dauber D. S., Ziermann R., Parkin N., Maly D. J., Mahrus S., Harris J. L., Ellman J. A., Petropoulos C. and Craik C. S. Altered substrate specificity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol* 2002; 76(3), 1359-68.
- De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res* 1998; 38(3), 153-79.
- Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(2), 153-64.
- Dierynck I., De Meyer S., Cao-Van K., Van Marck H., Lathouwers E., Thys K., Maes B. and de Béthune M.-P. *XVI International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007.*

- Doyon L., Croteau G., Thibeault D., Poulin F., Pilote L. and Lamarre D. Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 1996; 70(6), 3763-9.
- Doyon L., Payant C., Brakier-Gingras L. and Lamarre D. Novel Gag-Pol frameshift site in human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol* 1998; 72(7), 6146-50.
- Drake J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(9), 4171-5.
- Du Q., Thonberg H., Wang J., Wahlestedt C. and Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(5), 1671-7.
- DuBridge R. B., Tang P., Hsia H. C., Leong P. M., Miller J. H. and Calos M. P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 1987; 7(1), 379-87.
- Dulude D., Baril M. and Brakier-Gingras L. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(23), 5094-102.
- Dulude D., Berchiche Y. A., Gendron K., Brakier-Gingras L. and Heveker N. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 2006; 345(1), 127-36.
- Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. and Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 2001; 20(23), 6877-88.
- Fehér A., Weber I. T., Bagossi P., Boross P., Mahalingam B., Louis J. M., Copeland T. D., Torshin I. Y., Harrison R. W. and Tozser J. Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur J Biochem* 2002; 269(16), 4114-20.
- Freed E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998; 251(1), 1-15.
- Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic M., Shearer G. M., Kaplan M., Haynes B. F., Palker T. J., Redfield R., Oleske J., Safai B. and et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224(4648), 500-3.
- Garcia-Diaz A., Fox Z., Dragsted U. B., Kjaer J., Clumeck N., Philips A., Lundgren J. D. and Geretti A. M. *XVII International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2008.*
- Gatanaga H., Suzuki Y., Tsang H., Yoshimura K., Kavlick M. F., Nagashima K., Gorelick R. J., Mardy S., Tang C., Summers M. F. and Mitsuya H. Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem* 2002; 277(8), 5952-61.
- Gaudin C., Mazauric M. H., Traikia M., Guittet E., Yoshizawa S. and Fourmy D. Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J Mol Biol* 2005; 349(5), 1024-35.

- Girnaray R., King L., Robinson L., Elston R. and Brierley I. Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors. *J Gen Virol* 2007; 88(Pt 1), 226-35.
- Gottlieb M. S., Schroff R., Schanker H. M., Weisman J. D., Fan P. T., Wolf R. A. and Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981; 305(24), 1425-31.
- Gürtler L. G., Hauser P. H., Eberle J., von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J. M. and Kaptue L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994; 68(3), 1581-5.
- Hamaguchi K. and Geiduschek E. P. The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleotide helix. *J Am Chem Soc* 1962; 84, 1329-37.
- Hammer S., Squires K. and Degrulotta V. *6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, USA, 1999.*
- Heinzinger N. K., Bukinsky M. I., Haggerty S. A., Ragland A. M., Kewalramani V., Lee M. A., Gendelman H. E., Ratner L., Stevenson M. and Emerman M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(15), 7311-5.
- Hill M., Tachedjian G. and Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* 2005; 3(1), 73-85.
- Ho D. D., Neumann A. U., Perelson A. S., Chen W., Leonard J. M. and Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373(6510), 123-6.
- Ho S. K., Coman R. M., Bunger J. C., Rose S. L., O'Brien P., Munoz I., Dunn B. M., Sleasman J. W. and Goodenow M. M. Drug-associated changes in amino acid residues in Gag p2, p7(NC), and p6(Gag)/p6(Pol) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) display a dominant effect on replicative fitness and drug response. *Virology* 2008; 378(2), 272-81.
- Hoffman N. G., Schiffer C. A. and Swanstrom R. Covariation of amino acid positions in HIV-1 protease. *Virology* 2003; 314(2), 536-48.
- Honeyborne I., Prendergast A., Pereyra F., Leslie A., Crawford H., Payne R., Reddy S., Bishop K., Moodley E., Nair K., van der Stok M., McCarthy N., Rousseau C. M., Addo M., Mullins J. I., Brander C., Kiepiela P., Walker B. D. and Goulder P. J. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B\*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. *J Virol* 2007; 81(7), 3667-72.
- Huang M., Orenstein J. M., Martin M. A. and Freed E. O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 1995; 69(11), 6810-8.
- Janeway C. A. j., Travers P., Walport M. and Shlomchik M. "Immunologie." Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
- Jaworowski A. and Crowe S. M. Does HIV cause depletion of CD4+ T cells in vivo by the induction of apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999; 77(1), 90-8.

- Karacostas V., Wolffe E. J., Nagashima K., Gonda M. A. and Moss B. Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* 1993; 193(2), 661-71.
- Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmacol* 1931; 162, 480-487.
- Kaufmann G. R., Suzuki K., Cunningham P., Mukaide M., Kondo M., Imai M., Zaunders J. and Cooper D. A. Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17(6), 487-97.
- Kempf D. J., Marsh K. C., Kumar G., Rodrigues A. D., Denissen J. F., McDonald E., Kukulka M. J., Hsu A., Granneman G. R., Baroldi P. A., Sun E., Pizzuti D., Plattner J. J., Norbeck D. W. and Leonard J. M. Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3), 654-60.
- Knipe D. M., Howley P. M. and Griffin D. E. "Fields Virology." Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
- Kohli A., Parry C. and Pillay D. *XVI International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007.*
- Kolli M., Lastere S. and Schiffer C. A. Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate. *Virology* 2006; 347(2), 405-9.
- Kolli M., Stawiski E., Chappey C., Parkin N. and Schiffer C. A. *XVI International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007.*
- Kolli M., Stawiski E. W., Chappey C., Parkin N. T. and Schiffer C. A. *XVII International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2008.*
- Kräusslich H. G. Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(8), 3213-7.
- Lambert-Niclot S., Flandre P., Malet I., Canestri A., Soulie C., Tubiana R., Brunet C., Wirden M., Katlama C., Calvez V. and Marcelin A. G. Impact of gag mutations on selection of darunavir resistance mutations in HIV-1 protease. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(5), 905-8.
- Lastere S., Dalban C., Girard P. M., Costagliola D. and Brun-Vezinet F. *3<sup>rd</sup> European HIV Drug Resistance Workshop, Athens, Greece, 2005.*
- Léger M., Sidani S. and Brakier-Gingras L. A reassessment of the response of the bacterial ribosome to the frameshift stimulatory signal of the human immunodeficiency virus type 1. *Rna* 2004; 10(8), 1225-35.
- Loveday C. International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26 Suppl 1, S10-24.
- Maguire M. F., Guinea R., Griffin P., Macmanus S., Elston R. C., Wolfram J., Richards N., Hanlon M. H., Porter D. J., Wrin T., Parkin N., Tisdale M., Furfine E., Petropoulos C., Snowden B. W. and Kleim J. P. Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction

- of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *J Virol* 2002; 76(15), 7398-406.
- Malet I., Delelis O., Valantin M. A., Montes B., Soulie C., Wirden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J. F., Katlama C., Calvez V. and Marcelin A. G. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4), 1351-8.
- Malet I., Roquebert B., Dalban C., Wirden M., Amellal B., Agher R., Simon A., Katlama C., Costagliola D., Calvez V. and Marcelin A. G. Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients. *J Infect* 2007; 54(4), 367-74.
- Mammano F., Petit C. and Clavel F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 1998; 72(9), 7632-7.
- Maniatis T., Fritsch E. F. and J. S. "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor, 1982.
- Mink M., Mosier S. M., Janumpalli S., Davison D., Jin L., Melby T., Sista P., Erickson J., Lambert D., Stanfield-Oakley S. A., Salgo M., Cammack N., Matthews T. and Greenberg M. L. Impact of human immunodeficiency virus type 1 gp41 amino acid substitutions selected during enfuvirtide treatment on gp41 binding and antiviral potency of enfuvirtide in vitro. *J Virol* 2005; 79(19), 12447-54.
- Modrow S., Falke D. and Truyen U. "Molekulare Virologie." Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155, 335-50.
- Myint L., Matsuda M., Matsuda Z., Yokomaku Y., Chiba T., Okano A., Yamada K. and Sugiura W. Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(2), 444-52.
- Nijhuis M., Schipper P., King M., Bernstein B., Hanna G. and Boucher C. A. B. XVI *International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007a*.
- Nijhuis M., van Maarseveen N. M., de Jong D., Schipper P., Goedegebuure I. W. and Boucher C. A. B. XV *International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2006*.
- Nijhuis M., van Maarseveen N. M., Lastere S., Schipper P., Coakley E., Glass B., Rovenska M., de Jong D., Chappey C., Goedegebuure I. W., Heilek-Snyder G., Dulude D., Cammack N., Brakier-Gingras L., Konvalinka J., Parkin N., Krausslich H. G., Brun-Vezinet F. and Boucher C. A. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med* 2007b; 4(1), e36.
- Nijhuis M., Wensing A. M., Biermann W., de Jong D., van Rooyen W. J. M., Kagan R., Jaspers C., Schurink K., Lu L., Pilot-Matias T., Molla A., van Agtmael M. A. and Boucher C. A. B. XVI *International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, West Indies, 2007c*.
- Novina C. D., Murray M. F., Dykxhoorn D. M., Beresford P. J., Riess J., Lee S. K., Collman R. G., Lieberman J., Shankar P. and Sharp P. A. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002; 8(7), 681-6.

- Oette M. and Haussinger D. [Drug resistance in antiretroviral therapy of HIV infection]. *Med Klin (Munich)* 2003; 98(12), 692-9.
- Parkin N., Chappey C., Lam E. and Petropoulos C. *XIV International HIV Drug Resistance Workshop, Quebec, Canada, 2005.*
- Parkin N. T., Chamorro M. and Varmus H. E. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* 1992; 66(8), 5147-51.
- Parry C. M., Kohli A. and Pillay D. *XVII International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2008.*
- Pettit S. C., Moody M. D., Wehbie R. S., Kaplan A. H., Nantermet P. V., Klein C. A. and Swanstrom R. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol* 1994; 68(12), 8017-27.
- Pettit S. C., Sheng N., Tritch R., Erickson-Viitanen S. and Swanstrom R. The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. *Adv Exp Med Biol* 1998; 436, 15-25.
- Pillero P. J. Atazanavir: a novel HIV-1 protease inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11(9), 1295-301.
- Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E. A., King N. M. and Schiffer C. A. Structural basis for coevolution of a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid-p1 cleavage site with a V82A drug-resistant mutation in viral protease. *J Virol* 2004; 78(22), 12446-54.
- Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E. A., Romano K. and Schiffer C. A. Mechanism of substrate recognition by drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variants revealed by a novel structural intermediate. *J Virol* 2006; 80(7), 3607-16.
- Prado J. G., Honeyborne I., Brierley I., Puertas M. C., Martinez-Picado J. and Goulder P. J. Functional consequences of human immunodeficiency virus escape from an HLA-B\*13-restricted CD8+ T-cell epitope in p1 Gag protein. *J Virol* 2009; 83(2), 1018-25.
- Prado J. G., Parkin N. T., Clotet B., Ruiz L. and Martinez-Picado J. HIV type 1 fitness evolution in antiretroviral-experienced patients with sustained CD4+ T cell counts but persistent virologic failure. *Clin Infect Dis* 2005; 41(5), 729-37.
- Prado J. G., Wrin T., Beauchaine J., Ruiz L., Petropoulos C. J., Frost S. D., Clotet B., D'Aquila R. T. and Martinez-Picado J. Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *Aids* 2002; 16(7), 1009-17.
- Quercia R., Dam E., Descamps D., Duval X., Hance A. and Clavel F. *CROI, Boston, MA, US, 2008.*
- Ray A. S., Basavapathruni A. and Anderson K. S. Mechanistic studies to understand the progressive development of resistance in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to abacavir. *J Biol Chem* 2002; 277(43), 40479-90.
- Reil H., Kollmus H., Weidle U. H. and Hauser H. A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J Virol* 1993; 67(9), 5579-84.

- Salter R. D., Howell D. N. and Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 1985; 21(3), 235-46.
- Salzwedel K., Reddick M., Matallana C., Finnegan C., Adamson C., Sakalian M., Stanley D., Martin D., McCallister S., Freed E. and Allaway G. *XVII International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2008.*
- Sanchez-Merino V., Nie S. and Luzuriaga K. HIV-1-specific CD8+ T cell responses and viral evolution in women and infants. *J Immunol* 2005; 175(10), 6976-86.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977; 24, 104-8.
- Semeniuk C. A., McKinnon L., Peters H. O., Gubbins M., Mao X., Ball T. B., Luo M. and Plummer F. A. Multiple T-cell epitopes overlap positively-selected residues in the p1 spacer protein of HIV-1 gag. *Aids* 2009.
- Shehu-Xhilaga M., Kraeusslich H. G., Pettit S., Swanstrom R., Lee J. Y., Marshall J. A., Crowe S. M. and Mak J. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J Virol* 2001; 75(19), 9156-64.
- Sledz C. A. and Williams B. R. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 6), 952-6.
- Spearman C. The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *British Journal of Psychology* 1908; 2, 227-242.
- Staple D. W. and Butcher S. E. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 2005; 349(5), 1011-23.
- Telenti A., Martinez R., Munoz M., Bleiber G., Greub G., Sanglard D. and Peters S. Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J Virol* 2002; 76(15), 7868-73.
- Tremblay S., Bourgon L., Hall D., Elston R. C. and Bethell R. *4<sup>th</sup> IAS Conference on HIV, Sydney, Australia, 2007.*
- Ueda T., Myint L., Shiino T., Nishizawa M., Matsuda M. and Sugiura W. *XIV International HIV Drug Resistance Workshop, Quebec, Canada, 2005.*
- Valer L., de Mendoza C., Garcia F., Arnedo M., Domingo P., Ribas M., Saumoy M., Gutierrez C. and Soriano V. *3<sup>rd</sup> European HIV Drug Resistance Workshop, Athens, Greece, 2005.*
- van Maarseveen N. M., Wensing A. M., de Jong D., Taconis M., Borleffs J. C., Boucher C. A. and Nijhuis M. Persistence of HIV-1 variants with multiple protease inhibitor (PI)-resistance mutations in the absence of PI therapy can be explained by compensatory fixation. *J Infect Dis* 2007; 195(3), 399-409.
- Vogelstein B. and Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(2), 615-9.
- von der Helm K. Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol Chem* 1996; 377(12), 765-74.

- Walter H., Schmidt B., Korn K., Vandamme A. M., Harrer T. and Uberla K. Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Virol* 1999; 13(1-2), 71-80.
- Watkins T., Resch W., Irlbeck D. and Swanstrom R. Selection of high-level resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(2), 759-69.
- Whitcomb J. M. and Hughes S. H. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8, 275-306.
- Wu D. Y., Ugozzoli L., Pal B. K., Qian J. and Wallace R. B. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 1991; 10(3), 233-8.
- Zhang Y. M., Imamichi H., Imamichi T., Lane H. C., Falloon J., Vasudevachari M. B. and Salzman N. P. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* 1997; 71(9), 6662-70.

## 7 Abkürzungen

AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaar
CA	Kapsidprotein ( <i>capsid</i> )
CCD	charged-coupled device
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5
CD4 bzw. 8	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control (Atlanta)
cDNA	komplementäre DNA
CPE	Cytopathic effect
CS	Schnittstelle ( <i>cleavage site</i> )
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytosin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanin-5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Dideoxythymin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanin-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EB	elution buffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia/Epicurian coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
env	envelope-Gen des HIV-Genoms

FBS	fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
fs	Frameshift
fw	forward
gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	green fluorescent protein
gp120	Glykoprotein 120
gp41	Glykoprotein 41
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HIV-2	Humanes Immundefizienz Virus Typ 2
HxB2	Referenzstamm von HIV-1
IN	Integrase
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
LB	Luria broth base
LTR	long terminal repeats
MA	Matrixprotein
MHC	major histocompatibility complex
m.o.i.	multiplicity of infection
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NC	Nukleokapsidprotein
nc	nucleotide
Nedd-4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
nef	negative factor
NNRTI	nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PEG	Polyethylenglycol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Proteaseinhibitor
PR	Protease
pol	Polymerase-Gen des HIV-Genoms
POP-6/7	Performance Optimized Polymer 6 bzw. 7
rev	regulator of virion <i>oder</i> reverse

RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
RSV	respiratory syncytial virus
RT	reverse Transkriptase/Transkription
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SDM	site directed mutagenesis
SV40	Simian Virus 40
T20	Enfuvirtide (Fusionsinhibitor)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
tat	transactivator of transcription
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose
TE	therapie-erfahren
TFP	Transframeprotein
TN	therapie-naiv
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSB	transformation storage buffer
Tsg-101	tumor susceptibility gene 101
UV	Ultraviolettes Licht
V3	variable Loop 3
vif	viral infectivity factor
vpr	viral protein rapid
vpu	viral protein unknown
<i>wt</i>	Wildtyp

**IUB-Code**

A: Adenin	U: Uracil	S: G oder C	D: A, G oder T
C: Cytosin	K: G oder T	W: A oder T	H: A, C oder T
G: Guanin	M: A oder C	Y: C oder T	V: A, C oder G
T: Thymin	R: A oder G	B: C, G oder T	N: A, C, G oder T

**Internationales Abkürzungsverzeichnis für Aminosäuren**

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Asparagin	Asn	N	Lysin	Lys	K
Asparaginsäure	Asp	D	Methionin	Met	M
Arginin	Arg	R	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## 8 Zusammenfassung

Die hohe Variabilität von HIV ist bedingt durch die fehlende proof-reading Funktion der viralen reversen Transkriptase und führt zur Entstehung von Viren mit unterschiedlichsten Eigenschaften. Besonders die antiretrovirale Therapie führt neben dem Immunsystem zur Hemmung der Virusreplikation und so zur Selektion von speziell angepassten Virusvarianten. Das zunehmende Verständnis der Resistenz gegenüber den Proteaseinhibitoren führt dazu, dass mehr und mehr neben dem Enzym auch dessen Substrat, die Schnittstellen der Protease in den Vorläuferproteinen, analysiert werden. In dieser Arbeit wurde der Genbereich näher untersucht, der die spezifischen Aminosäuresequenzen für vier Schnittstellen der HIV-Protease in zwei Leserahmen kodiert, und darüber hinaus, auf RNA-Ebene verantwortlich für ein Frameshiftereignis ist, das die Entstehung der viralen Enzyme ermöglicht. Es wurden Veränderungen zwischen therapie-naiven und therapie-erfahrenen HIV-Isolaten untersucht, so dass eine Reihe von therapie-assoziierten Mutationen identifiziert werden konnte. Diese Veränderungen, die in erster Linie in den Gag-Schnittstellen lagen, waren eng mit resistenz-assoziierten PR-Mutationen korreliert. Auf RNA-Ebene fanden sich, neben einer Reihe von Polymorphismen, zwei therapie-assoziierte Mutationen innerhalb des frameshiftregulierenden Bereichs. Die gemessenen Frameshifttraten von HIV-Isolaten aus Patientenproben zeigten, dass die meisten Veränderungen innerhalb dieser Region zu keiner signifikanten Veränderung der Frameshifffizienz führten, unabhängig davon, ob es sich um Insertionen, Deletionen, einzelne oder multiple Punktmutationen handelte. Wenige HIV-Isolate zeigten eine deutlich reduzierte Frameshifffizienz, besonders bei Veränderung innerhalb der slippery site. Eine therapie-assoziierte Schnittstellenmutation führte bei gleichzeitigem Vorliegen zweier weiterer Polymorphismen zu einer leicht erhöhten Frameshifffizienz, wobei nur 9% der HIV-Isolate mit dieser Schnittstellenveränderung diese Kombination aufwiesen. Die Schnittstellenmutation L449F führte durch das Entstehen einer zweiten slippery site zur gleichermaßen erhöhten Frameshifttrate. Insgesamt erwies sich eine Änderung der Frameshifffizienz als kein genereller Mechanismus der Resistenz gegenüber antiretroviralen Medikamenten. Virusreplikationskinetiken von HIV-Isolaten von therapie-naiven Patienten mit dieser Schnittstellenmutation, die eventuell auf der Übertragung eines PI-resistenten Virus beruht, zeigten darüber hinaus, dass die Frameshifttrate nicht für die veränderte Substratfunktion kompensieren konnte. Vielmehr könnten Mutationen im entfernteren Gag-Bereich kompensatorische Funktionen beim Verbleib von L449F ausüben. Abschließend konnte gezeigt werden, dass diese funktionsreiche Region sich sehr gut als Ziel für Replikationsinhibition mittels siRNA eignet.

## 9 Abstract

The high variability of HIV is caused by the absence of the proof-reading function of the viral reverse transcriptase and the induction of viruses with different phenotypes. Besides the pressure of the immune system, also antiviral therapy leads to the repression of viral replication and to the selection of adapted virus variants. Increasing understanding of resistance to protease (PR) inhibitors increases the interest to analyse the enzyme itself and its substrate, in particular the cleavage sites in precursor proteins. During this thesis work, two different frames of the gene region, which encodes four cleavage sites of the HIV-PR, were analysed. Since this region is also responsible for a frame shift event, which enables synthesis of viral enzymes, RNA sequences were examined. Differences between therapy-naive and therapy-experienced HIV-isolates were studied and a number of therapy-associated mutations was identified. These mutations, primarily found in Gag cleavage sites, showed tight correlations with resistance-associated PR-mutations. Besides a number of polymorphisms, two therapy-associated mutations on RNA level in the frame shift regulating region were found. The frame shift efficiencies of HIV-isolates showed that most of the mutations in this region do not lead to a significant change in the frame shift efficiency, independent of the mutation type (e.g. insertions, deletions, point or multiple mutations). Only a few HIV-isolates showed a strong reduction in the frame shift efficiency, especially those with a destroyed slippery site. In contrast, a therapy-associated cleavage site mutation with two further polymorphisms showed only a slight increase in the frame shift efficiency, but only 9% of HIV-isolates with this mutation showed this specific combination. The cleavage site mutation L449F leads to a significant increase in the frame shift efficiency, because of the occurrence of a second slippery site. In summary, an increase in frame shift efficiency is not a general mechanism of HIV drug resistance. Moreover, virus replication kinetics of HIV-isolates from therapy-naive patients with this cleavage site mutation, potentially originated from the transmission of a PI-resistant virus, showed that the increased frame shift efficiency could not compensate for the changed substrate function. In fact, mutations in the distant Gag region could fulfill a compensatory task in viruses with L449F. Additionally, this region is a very good target for inhibition of viral replication using siRNA.

## 10 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Dr. Jens Verheyen, der mich während meiner Promotion beratend begleitet hat. Ihm danke ich vor allem für die richtungsweisenden fachlichen Diskussionen und den unermüdlichen Einsatz, besonders bei der Korrektur dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Herbert Pfister bedanke ich mich für die Betreuung dieser Promotion und die konstruktiven Hinweise und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth und Herrn Prof. Dr. Einhard Schierenberg danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Rolf Kaiser, der mich in seiner Arbeitsgruppe herzlich aufgenommen hat, sowie allen, auch ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit stets sowohl praktisch, als auch theoretisch unterstützt haben: Melanie Balduin, Ibrahim Boussaad, Martin Däumer, Maria Fraune, Dörte Hammerschmidt, Eva Heger, Claudia Müller, Nadine Sichtig, Saleta Sierra-Aragon, Eugen Schülter, Finja Schweitzer, Monika Timmen-Wego und Susanna Trapp. Daraus haben sich einige Freundschaften entwickelt, wobei ich Maria Fraune hier besonders hervorheben möchte.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die herzliche Atmosphäre und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft, besonders Martin Hufbauer, Nadine Körfer, Jenny Pahne, Stephanie Töpfer und Andreas Müller-Schiffmann.

Prof. Dr. Daniel Hoffmann, Dr. Ulrike Schuldenzucker, Andrea Hauser, Dr. Carola Pongratz und der RESINA Study-group möchte ich für ihre Unterstützung danken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir nicht nur das Studium der Biologie ermöglicht haben, sondern mich auch sonst in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützt haben, an meinen kleinen großen Bruder mit den besten Ratschlägen und an meine Freunde, die immer für mich da sind, besonders Flavia.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann bedanken, der mich bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe und stets mein Ruhepol gewesen ist. Ihm widme ich diese Arbeit.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln des Köln Fortune Forschungsförderungsprogramms und des Bundesministeriums für Gesundheit finanziert.

## 11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. h.c. Herbert Pfister betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Jens Verheyen, Elena Litau, Tobias Sing, Martin Däumer, Melanie Balduin, Mark Oette, Gerd Fätkenheuer, Jürgen K. Rockstroh, Ulrike Schuldenzucker, Daniel Hoffmann, Herbert Pfister, Rolf Kaiser

**Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients**

Antiviral Therapy 11 (7): 879-887, 2006

2. Jens Verheyen, Elena Knops, Bernd Kupfer, Osamah Hamouda, Sybille Somogyi, Ulrike Schuldenzucker, Daniel Hoffmann, Rolf Kaiser, Herbert Pfister, Claudia Kücherer

**Prevalence of C-terminal gag cleavage site mutations in HIV from therapy-naive patients**

Journal of Infection 58, 61-67, 2009

3. Jens Verheyen, Chris Verhofstede, Elena Knops, Linos Vandekerckhove, Axel Fun, Diede Brunen, Kenny Dauwe, Annemarie Wensing, Herbert Pfister, Rolf Kaiser, Monique Nijhuis

**High prevalence of bevirimat resistance mutations in PI resistant HIV isolates**

eingereicht

Köln, 28.04.2009

---

Elena Knops