

**Evolutionsdynamik des *pol*-Gens bei HIV-1 infizierten
Patienten unter geänderten selektiven Druck**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Melanie Balduin

aus Rheinbach

2008

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Pfister

Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Roth

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Karin Schnetz

Beisitzer: Dr. rer. nat. Rolf Kaiser

Tag der Disputation: 03. Juli 2008

Schriftenreihe Infektiologie

Band 14

Melanie Balduin

**Evolutionsdynamik des *pol*-Gens
bei HIV-1 infizierten Patienten
unter geändertem selektiven Druck**

D 38 (Diss. Universität zu Köln)

Shaker Verlag
Aachen 2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Köln, Univ., Diss., 2008

Kontakt zum Herausgeber: mark@oette.de

Umschlaggestaltung: Raimund Spierling, www.spierling-art.de

Copyright Shaker Verlag 2009

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-8690-3

ISSN 1614-4899

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Vorwort

Die Resistenz gegenüber antiretroviralen Medikamenten stellt ein wichtiges Hindernis für eine erfolgversprechende medikamentöse Therapie der Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus dar. Daher ist die Kenntnis über Mechanismen und Epidemiologie resistenzassoziierter Mutationen sowie die Implikationen für die Behandlung essenziell, um das Problem HIV-Resistenz zu beherrschen.

Melanie Balduin widmet sich in ihrer Dissertation der HIV-Resistenz in verschiedenen Kollektiven und besonderen Krankheitsstadien. Sie evaluiert den Verlauf der Resistenz in Therapiepausen und studiert die Prävalenz von Resistenzen in Minoritätenpopulationen bei therapienaiven Patienten. Sie entwickelt hierbei neue virologische Methoden und stellt ihre Ergebnisse in den Zusammenhang des aktuellen wissenschaftlichen Diskurses. Einzelne Mutationen werden hinsichtlich der Entwicklung eines möglichen Therapieversagens analysiert.

Die Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis viraler Resistenzmechanismen. Am Beispiel der HIV-Infektion werden Techniken aufgezeigt, Mutationen in Hinblick auf ein mögliches virologisches Versagen besser zu charakterisieren und in Handlungsalgorithmen für eine effektivere Therapieplanung zu adaptieren. Daher ist der Publikation eine weite Verbreitung zu wünschen.

Köln, September 2009

Dr. rer. nat. Rolf Kaiser

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Humane Immundefizienz Virus (HIV).....	1
1.2	HIV-1 Viruspartikel und Genomaufbau	2
1.3	Genomaufbau und HIV-1-Proteine	3
1.3.1	Das gag-Gen und die Gag-Proteine	3
1.3.2	Das pol-Gen und dessen Genprodukte	4
1.3.3	Das env-Gen und die akzessorischen Gene	5
1.4	Replikationszyklus des HIV.....	6
1.5	Pathogenese und Infektionsverlauf bei HIV-1	7
1.5.1	Pathogenese.....	7
1.5.2	Infektionsverlauf	8
1.6	Antiretrovirale Therapie.....	10
1.7	Resistenzentwicklung.....	12
1.8	Resistenzbestimmung	13
1.8.1	Phänotypische Resistenztestung	13
1.8.2	Genotypische Resistenztestung	13
1.8.3	Einsatz der Resistenzuntersuchungen	14
1.9	Therapiepausen	14
1.10	Nachweis von Minderheitenpopulationen	16
1.11	Ziel der Arbeit:	17
2	Material und Patienten	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Bakterienstamm	18
2.1.2	Nukleinsäuren	18
2.1.3	Enzyme und Enzyminhibitoren	20
2.1.4	Reagenziensysteme	21
2.1.5	Lösungen, Puffer und sonstige Chemikalien	21
2.1.6	Medien.....	22
2.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterial	23
2.1.8	Software zur Auswertung erzeugter Sequenzdaten.....	24
2.1.9	Datenbanken:	24
2.2	Patienten	24
2.2.1	Patientenkollektiv 1: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“, „in“ und „nach“ einer Therapiepause	24
2.2.2	Patientenkollektiv 2: Seren stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten „vor“ und „in“ einer Therapiepause	25
2.2.3	Patientenkollektiv 3: Seren therapie-naiver HIV-1 infizierter Patienten	25
3	Methoden.....	27
2.2.4	Weitere Patientenproben	26
3.1	Isolierung viraler RNA HIV infizierter Patienten.....	27
3.1.1	Abtrennung der Zellbestandteile von EDTA- Blut	27
3.1.2	Prinzip der HIV-RNA Isolierung	27
3.2	Reverse Transkription	27
3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.3.1	„Hot start“ PCR	28
3.3.2	„Nested“ PCR.....	28
3.3.3	„Touch down“ PCR	28
3.3.4	„One Step“ RT-PCR.....	29

3.4	<i>Amplifikation des Protease- und Reverse Transkriptase- kodieren Gens pol von HIV-1</i>	29
3.4.1	„One Step“ RT-PCR und „Nested“ PCR (Standardmethode, „in house“-System).	29
3.5	<i>HIV Genotyping Kit (RT-PCR; kommerzielle Methode)</i>	31
3.6	<i>Sequenzierung</i>	32
3.6.1	Sanger-Methode der DNA Sequenzierung	32
3.6.2	Sequenzreaktion	33
3.7	<i>Aufreinigung der Sequenzprodukte</i>	34
3.8	<i>Sequenzierung</i>	35
3.9	<i>Sequenz-Analyse</i>	36
3.9.1	Sequenzbearbeitung	36
3.9.2	Sequenzinterpretation	36
3.10	<i>DNA-Standardmethoden</i>	37
3.11	<i>Bakterienkultur und -Methoden</i>	37
3.11.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	37
3.11.2	Transformation kompetenter Bakterien	37
3.11.3	Langzeitlagerung von Bakterien	38
3.11.4	Kulturen zur Plasmidisolierung	38
3.11.5	Plasmidpräparationen	38
3.11.6	Kolonie-PCR zur Kontrolle des Inserts	38
3.12	<i>Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR</i>	39
3.13	<i>Herstellung eines Plasmids mit integrierter Wildtyp Protease und Reverse Transkriptase</i>	39
3.14	<i>In vitro Mutagenese</i>	40
3.15	<i>Minderheitendetektion mittels Echtzeit-PCR</i>	41
3.15.1	SYBR-Green	42
3.15.2	TaqMan-Sonden	42
3.15.3	Hybridisierungs-Sonden	42
3.15.4	Quantifizierung der Standardplasmide	43
3.15.5	Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT	44
3.15.6	Detektion von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103	45
3.15.7	Detektion von Minderheitenpopulationen in der Protease	47
4	Ergebnisse	49
4.1	<i>Detektion resistenzassoziierter Mutationen durch Direktsequenzierung</i>	49
4.1.1	Amplifikation und Sequenzierung der Protease und der Reversen Transkriptase des pol- Gens von HIV-1	49
4.1.2	Evolution von Virusvarianten unter geändertem selektiven Druck in einer Therapiepause	51
4.1.3	Evolution von Virusstämmen stark vorbehandelter HIV-1 infizierter Patienten vor und in einer Therapiepause (Patientenkollektiv 2)	64
4.2	<i>Minderheitendetektion mittels Echtzeit PCR</i>	74
4.2.1	Herstellung von Standardplasmiden für die Echtzeit-PCR	74
4.2.2	Minderheitendetektion an Aminosäureposition 70 der RT	75
4.2.3	Nachweis und Analyse von Minderheitenpopulationen in der Reversen Transkriptase an Aminosäureposition 103 (Patientenkollektiv 3)	82
4.2.4	Analyse und Auswirkungen von Minderheitenpopulationen an Position V82A der Protease	89
5	Diskussion	91
5.1	<i>Therapiepause</i>	91

5.2	<i>Minoritätendetektion</i>	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Abkürzungen	111
8	Zusammenfassung	114
9	Abstract	115
10	Danksagung.....	116
11	Erklärung	117
12	Lebenslauf	118
13	Anhang.....	119