

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

Optimierung der Amplifikation des kompletten HIV-1 pol-Gens zur
Untersuchung der Koevolution von Resistenzmutationen innerhalb
einer HIV Quasispezies

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Robin Michael Frese
geb. Folgnandt

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. pol. Svenja Caspers

Für meine Oma Renate Bilstein

(*22.05.1941 - †30.03.2021)

Alles was aus mir geworden ist,

verdanke ich deiner Liebe.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen und Kongressen vorgestellt:

- „All-in-one HIV-1 pol PCR for analysis of drug resistant HIV-1 pol quasispecies heterogeneity by Next-Generation Sequencing and Clone-Based Sequencing”, 16th European Meeting on HIV & Hepatitis in Rome/Italy 30.05.-01.06.2018
- “All-in-one” HIV-1 pol-PCR and Next-Generation-Sequencing for the analysis of drug resistant HIV-1 pol quasispecies”, 21th ESCV Annual Meeting in Athen/Greece 23.09.-26.09.2018
- „All-in-one HIV-1 pol-PCR zur Analyse der arzneimittelresistenten HIV-1 pol Quasispezies durch NGS und CBS“, 12. Workshop des Arbeitskreises „Klinische Virologie“ der GfV in Zeilitzheim 09./10.11.2018

ZUSAMMENFASSUNG

Die derzeitigen Leitlinien zur antiretroviralen Therapie von HIV Patienten empfehlen die Integrase-Inhibitoren als potente Kombinationspartner mit einer breiten Wirksamkeit gegen multiresistente HIV-Stämme. Daher gewinnt die Analyse von Resistenzen gegen Integrase-Inhibitoren an besonderer Bedeutung. Von großem Interesse ist dabei auch die Anwendbarkeit von ultratiefen Sequenzierverfahren wie dem Next-Generation Sequencing (NGS), zur Untersuchung von Resistenzprofilen. Die gemeinsame Amplifikation von Protease und reverser Transkriptase im pol-Gen ist derzeit etabliert, wohingegen die 3'-Integrase-Region separat sequenziert und analysiert wird. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen und stabilen subtypunabhängigen All-in-one PCR der kompletten HIV-1 pol-Genregion, um eine Analyse der Koexistenz von Resistenzmutationen in den verschiedenen Genregionen zu ermöglichen. Das weitere Ziel der Arbeit bestand darin, den Vergleich von NGS und Klon-basierter Sequenzierung (CBS) zur Analyse der Heterogenität der arzneimittelresistenten HIV-1 Quasispezies durchzuführen. Die All-in-one pol-PCR wurde unter Verwendung von Zellkulturüberständen und HIV-1-Plasmaproben aus der RESINA-Kohorte erstellt. Um das pol-Gen subtypenunabhängig zu amplifizieren, wurde ein neues PCR-Protokoll etabliert, welches aus einer einstufigen RT-PCR mit RNA-Präinkubation mit T4gp32 und anschließender Nested-PCR besteht. Dieses ermöglichte sowohl die Amplifikation des pol-Gens verschiedener HIV-1 Subtypen, als auch die Amplifikation bei niedrigeren HIV Viruslasten. Der Vergleich von NGS und CBS wurde retrospektiv mit pol-Fragmenten von zehn multiresistenten HIV-1 Subtyp B Stämmen durchgeführt, die durch routinemäßige Resistenzdiagnostik im Rahmen der RESINA Studie nachgewiesen wurden. Die Klonierung wurde durch isothermalen Zusammenbau nach Gibson mit anschließender klassischer Sanger Sequenzierung der pol-Klone durchgeführt. NGS der pol-PCR-Produkte erfolgte mittels Illumina Mi-Seq-Technologie. Die Resistenzprofile aller pol-Klone der zehn Patientenproben zeigten eine signifikante Korrelation der detektierten Resistenzmutationen durch CBS und NGS. Damit konnte gezeigt werden, dass NGS nicht nur eine hohe Sensitivität zum Nachweis von Resistenzen liefert, sondern auch die Heterogenität der HIV-1 pol-Quasispezies widerspiegelt. Das optimierte All-in-one pol PCR-Protokoll stellt einen neu entwickelten HIV-1 Resistenztest dar, der es ermöglicht, in der klinischen Routine eine subtypenunabhängige Resistenzanalyse aller klinisch relevanten viralen Enzyme durchzuführen. Die zusätzliche Nutzung von ultratiefen Sequenzierverfahren ermöglicht zudem den Nachweis von minor resistanten Varianten innerhalb der HIV-Quasispezies.

ABSTRACT

The current guidelines for antiretroviral therapy of HIV patients recommend integrase inhibitors as potent combination partners with broad efficacy against multi-drug-resistant HIV strains. Therefore, the analysis of resistances against integrase inhibitors gains special importance. The applicability of ultra-deep sequencing methods such as Next-Generation Sequencing (NGS) for the analysis of resistance profiles is also of great interest. The joint amplification of protease and reverse transcriptase in the pol gene is currently established, whereas the 3' integrase region is sequenced and analysed separately. The aim of this work was the development of a new and stable subtype-independent all-in-one PCR of the complete HIV-1 pol gene region to enable the coanalysis of resistance mutations in the different gene regions. The further aim of the work was to compare NGS and clone-based sequencing (CBS) to analyse the heterogeneity of the drug-resistant HIV-1 quasispecies. All-in-one pol PCR was performed using cell culture supernatants and HIV-1 plasma samples from the RESINA cohort. To amplify the pol gene subtype-independently, a new PCR protocol was established, consisting of a one-step RT-PCR with RNA preincubation with T4gp32 and subsequent nested PCR. This enabled the amplification of the pol gene of different HIV-1 subtypes as well as at lower HIV virus loads. The comparison of NGS and CBS was performed retrospectively with pol fragments of ten multi-resistant HIV-1 subtype B strains detected by routine resistance diagnostics in the RESINA study. Cloning was performed by Gibson assembly followed by classical Sanger sequencing of the pol clones. NGS of the pol PCR products was performed using Illumina MiSeq technology. The resistance profiles of all pol clones of the ten patient samples showed a significant correlation of detected resistance mutations by CBS and NGS. Thus, it could be shown that NGS not only provides a high sensitivity for the detection of resistance but also reflects the heterogeneity of the HIV-1 pol quasispecies. The optimized all-in-one pol PCR protocol represents a newly developed HIV-1 resistance test, which enables a subtype-independent resistance analysis of all clinically relevant viral enzymes in clinical routine. The additional use of ultra-deep sequencing techniques also allows the detection of minor resistant variants within the HIV quasispecies.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3TC	Lamivudin
A	Absorption
ABC	Abacavir
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALIX	ALG-2 interacting protein X
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit
ART	Antiretrovirale Therapie
bp	Basenpaare
CA	Capsid
CBS	Clone-Based Sequencing
CCD	charge coupled device
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Cluster of differentiation 4
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CRFs	circulating recombinant forms
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DRM	Drug Resistance Mutation

EACS	European AIDS clinical society
EB	Elution Buffer
Env	envelope. Glykoprotein in der HIV-Hüllmembran
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FTC	Emtricitabin
Fw	forward
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IN	Integrase
INIs	Integrase-Inhibitoren
Kb	Kilobasen
LB	lysogeny broth
LEDGF	lens epithelium-derived growth factor
LLV	low-level-Virämie
LTR	long terminal repeat
MA	Matrix
MMLV	Murines Leukämievirus

mRNA	messenger RNA
NC	Nucleocapsid
NEB-5-alpha	New England Biolabs kompetenter E.coli
Nef	negative regulatory factor
NGS	Next-Generation Sequencing
nm	Nanometer
NNRTI	Nicht Nukleosidartige Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidartige Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NtRTI	Nukleotidanalogue Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame, offenes Leseraster
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PCR	polymerase chain reaction
PI	Protease Inhibitoren
PIC	Präintegrationskomplex
PIK	Präintegrationskomplex
pol	Polymerase
PR	Protease
PrEP	Postexpositionsprophylaxe
PRRT	Protease + Reverse Transkriptase
P-TEFb	positive transcription elongation factor b

RESINA	primary drug RESistance in treatment Naïve HIV infected patients
Rev	reverse
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse Transkriptase
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
Seq	Sequenz
SMRT	single molecule real-time
SNP	single nukleotide polymorphism
SU	Oberflächenmembranprotein
T4gp32	T4 Gene 32 Protein
TAF	Tenofovirafenamid
Tat	Transactivator Protein
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TDF	Tenofovir-Disoproxilfumerat
TF	Transframe Protein
TRIM	tripartite motif
tRNA	Transfer RNA
vif	viral infectivity factor
vpr	virales Protein R
vpu	virales Protein U

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion	1
1.2 HIV-1 Subtypen	2
1.3 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)	3
1.4 Replikationszyklus des HI-Virus	4
1.5 pol-Genregion	6
1.5.1 Protease	7
1.5.2 Reverse Transkriptase	7

1.5.3	Integrase	7
1.6	Antiretrovirale Therapie.....	8
1.7	Resistenz-assoziierte Mutationen (DRMs).....	10
1.8	Resistenztestung	11
1.8.1	Genotypische Resistenztestung.....	11
1.8.2	Phänotypische Resistenztestung	12
1.9	Ziel der Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	16
2.1.5	Zellkulturmedien.....	17
2.1.6	Größenstandard	17
2.1.7	HIV-1 Proben	17
2.1.8	Primer.....	18
2.1.9	pUC18 Plasmid	19
2.1.10	Zellen	19
2.1.11	Enzyme.....	20
2.1.12	Kits.....	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Extraktion	21
2.2.2	HIV-1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.3	RNA-Präinkubation	21

2.2.4	RT-PCR.....	22
2.2.5	Kapillarelektrophorese.....	25
2.2.6	DNA Aufreinigung	25
2.2.7	NanoDrop Konzentrationsmessung	25
2.2.8	Q5-Polymerisation.....	26
2.2.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	27
2.2.10	Ligationsberechnung.....	27
2.2.11	Klonierung mit „Gibson Assembly“	28
2.2.12	Bakterientransformation	29
2.2.13	Bakterienkultur	30
2.2.14	Mini-Plasmid-Präparation.....	30
2.2.15	Analytische Restriktionsanalyse.....	30
2.2.16	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.17	Sanger-Sequenzierung	32
2.2.18	Next-Generation Sequencing Methoden.....	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Optimierung der pol-PCR.....	35
3.1.1	HIV-1 Subtyp B	38
3.1.2	HIV-1 Non-B-Subtypen.....	42
3.2	Stabilisierung der subtypunabhängigen pol-Amplifikation durch T4gp32.....	46
3.3	Herstellung von rekombinanten pol-Vektoren zur klonalen Sequenzanalyse	49
3.4	Vergleich der Quantifizierung von Resistenzmutationen mittels klonaler Analyse (CBS) vs. NGS	53

3.4.1	Quantifizierung der resistenten Varianten innerhalb einer HIV-Quasispezies	53
3.4.2	Analyse der Koexistenz von Resistenzmutationen in verschiedenen Genregionen einzelner Virusvarianten	61
4	DISKUSSION	63
4.1	Optimierung der Amplifikationsmethode des HIV-1 pol-Gens	63
4.2	Möglichkeiten der Resistenzanalyse	66
4.2.1	Resistenzanalyse durch CBS	67
4.2.2	Resistenzanalyse durch NGS	67
4.2.3	Analyse und Vergleich CBS und NGS	68
4.3	Untersuchung der Koevolution von Resistenzmutationen.....	72
4.4	Klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit	73
5	LITERATURVERZEICHNIS	75
6	DANKSAGUNG.....	82

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Geschätzte Gesamtzahl der HIV-Neuinfektionen in Deutschland seit Beginn der HIV-Epidemie 1975-2019 nach Infektionsjahr..	1
Abbildung 2:	Anteil einzelner HIV-1 Subtypen unter den analysierten HIV-Neudiagnosen in Deutschland der Jahre 2013-2016.....	3
Abbildung 3:	Aufbau und Struktur von HIV mit Lokalisierung der Proteine	4
Abbildung 4:	Replikationszyklus von HIV und Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente	5
Abbildung 5:	HIV-1 Genom.....	6
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der pol-Region des HIV Genoms....	7
Abbildung 7:	Deutsch-Österreichische Leitlinien zur ART der HIV Infektion Stand 04/2019	9
Abbildung 8:	pUC18 Vektorkarte	19
Abbildung 9:	Gibson Assembly.....	29
Abbildung 10:	Bgl I-Schnittstellen im pUC18 Vektor.....	31
Abbildung 11:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 B-Subtypen nach RT-Schritt bei 50°C	38
Abbildung 12:	Sanger-Sequenzierung des unspezifischen pol-PCR-Produktes am Beispiel von Probe D16-58340	39
Abbildung 13:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 B-Subtypen nach RT-Schritt bei 50°C und 60°C	40
Abbildung 14:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 Subtyp B Proben nach RT-Schritt bei 60°C	41
Abbildung 15:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von verschiedenen HIV-1 B-Subtypen nach RT Schritt bei 50°C. .	42
Abbildung 16:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von unterschiedlichen HIV-1 non-B-Subtypen nach RT Schritt bei 50°C.....	43
Abbildung 17:	pol-PCR mit dem Protokoll II ohne/mit RNA-Präinkubation bei non-B-Subtypen.....	44
Abbildung 18:	Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 non-B-Subtypen nach RT Schritt bei angepassten Bedingungen.....	45

Abbildung 19: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von diversen HIV-1 Subtypen unter Verwendung von T4gp32	47
Abbildung 20: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von ausgewählten Proben unter Verwendung von T4gp32	48
Abbildung 21: Übersichtsdarstellung der Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte aller verwendeten HIV-1 B-Subtypen zur Herstellung rekombinanter HIV-Vektoren	51
Abbildung 22: Analytische Restriktionsanalyse mittels Bgl I Restriktionsanalyse	52
Abbildung 23: Pearson Korrelation der Resistenzmutationen aller Proben detektiert über NGS und klonale Analyse	58
Abbildung 24: Pearson Korrelation der Resistenzmutationen aller Klone	59

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	RNA-Präinkubation	21
Tabelle 2:	Ansatz für RT-PCR	22
Tabelle 3:	RT-PCR	23
Tabelle 4:	Ansatz für Nested-PCR.....	24
Tabelle 5:	Nested-PCR.....	24
Tabelle 6:	Ansatz für Q5-Polymerisation	26
Tabelle 7:	Q5-PCR	27
Tabelle 8:	Protokoll I RT-PCR.....	36
Tabelle 9:	Protokoll I Nested-PCR.....	36
Tabelle 10:	Protokoll II RT-PCR.....	37
Tabelle 11:	Protokoll II Nested-PCR.....	37
Tabelle 12:	Resistenzprofile ausgewählter Plasmaproben zur Herstellung von rekombinanten HIV-Konstrukten.....	50
Tabelle 13:	Vergleich der prozentualen Häufigkeit der detektierten Resistenzmutation über klonale Sequenzierung (CBS) vs. NGS	54
Tabelle 14:	Übersichtstabelle der diskrepanten Mutationshäufigkeiten zwischen Clone-based Sequencing (CBS) und Next-Generation Sequencing (NGS).....	60

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie der HIV-Infektion

Die Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) geht unbehandelt mit der Entwicklung von AIDS einher und gehört global bis dato zu den größten medizinischen Herausforderungen der Neuzeit. Weltweit sind über 37,9 Millionen Menschen mit HIV infiziert [1]. Allein in Deutschland wird dabei nach der letzten Erhebung aus dem Jahr 2019 von 90 700 Menschen ausgegangen, die mit einer HIV Infektion leben. Die Neuinfektionsraten mit dem HI-Virus zeigten hier zu Lande einen stetigen Anstieg mit einem darauffolgenden Rückgang (Abbildung 1) und pendelten sich auf ca. 2600 neuinfizierte Personen im Jahr 2019 auf einem hohen Niveau ein [2].

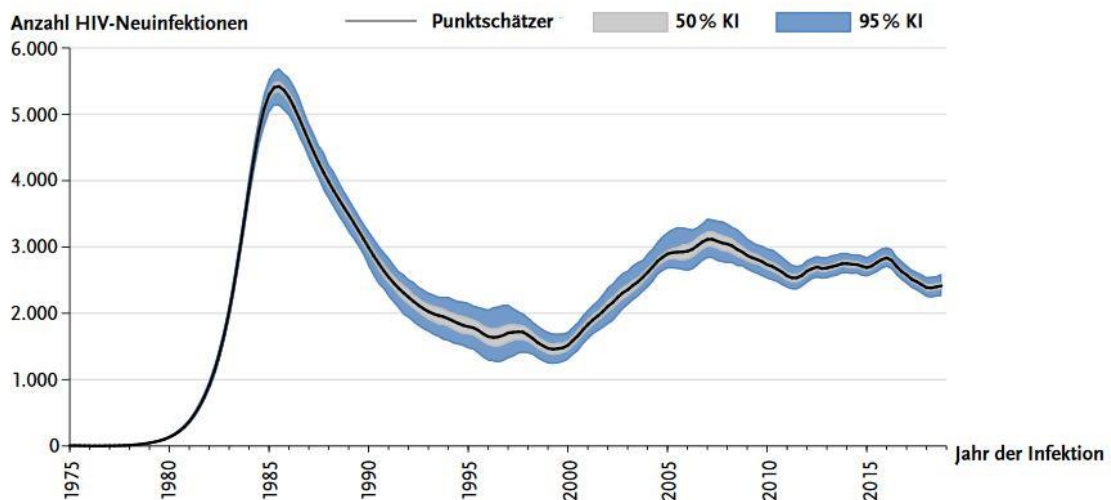


Abbildung 1: Geschätzte Gesamtzahl der HIV-Neuinfektionen in Deutschland seit Beginn der HIV-Epidemie 1975-2019 nach Infektionsjahr.

Quelle: [2]

Die weltweite Anzahl an HIV-Neuinfektionen im Jahr 2018 lag bei 1,7 Millionen [1]. Aktuell gehören die Prävention durch Vorbeugung vor der Exposition (PrEP), eine schnelle und engmaschige diagnostische Testung bei gefährdeten Personen und die unmittelbare Einleitung einer antiretroviralen Therapie (ART) nach einer bestätigten Infektion zu den wichtigsten Maßnahmen, um die Anzahl der HIV Infektionen in der westlichen Welt zu verringern [3].

1.2 HIV-1 Subtypen

HIV-1 wird phylogenetisch in die vier Gruppen M (main), O (outlier), N (new) und P (non M, non O) unterteilt. Die Gruppe M umfasst 9 Subtypen (A, B, C, D, F, G, H, J und K, sowie den neu identifizierten Subtyp L [4]) mit den Subsubtypen A1, A2, F1 und F2, sowie mindestens 101 weitere rekombinante Formen (CRFs). Auf die Gruppe M fällt der Großteil der HIV-1 Infektionen weltweit, die Infektionen der Gruppen O, N und P beschränken sich hauptsächlich auf den afrikanischen Kontinent [5]. Die Subtypen der Gruppe M treten weltweit in einer unterschiedlichen Häufigkeit auf. So sind die meisten Infektionen in Europa vom Subtyp B mit > 66 %, während Non-B-Subtypen nur einen geringen Anteil der Infektionen bedingen [6]. In Deutschland überwiegt mit 68,8 % ebenfalls der Subtyp B bei den HIV Infektionen im Jahr 2018 (Abbildung 2). Allerdings lässt sich ein signifikanter Trend zu häufigeren Infektionen mit Non-B-Subtypen feststellen [7]. Dabei überwiegt der bisher in Osteuropa verbreitete Subtyp A, sowie der in Afrika verbreitete Subtyp C und die weiteren rekombinanten Formen [8].

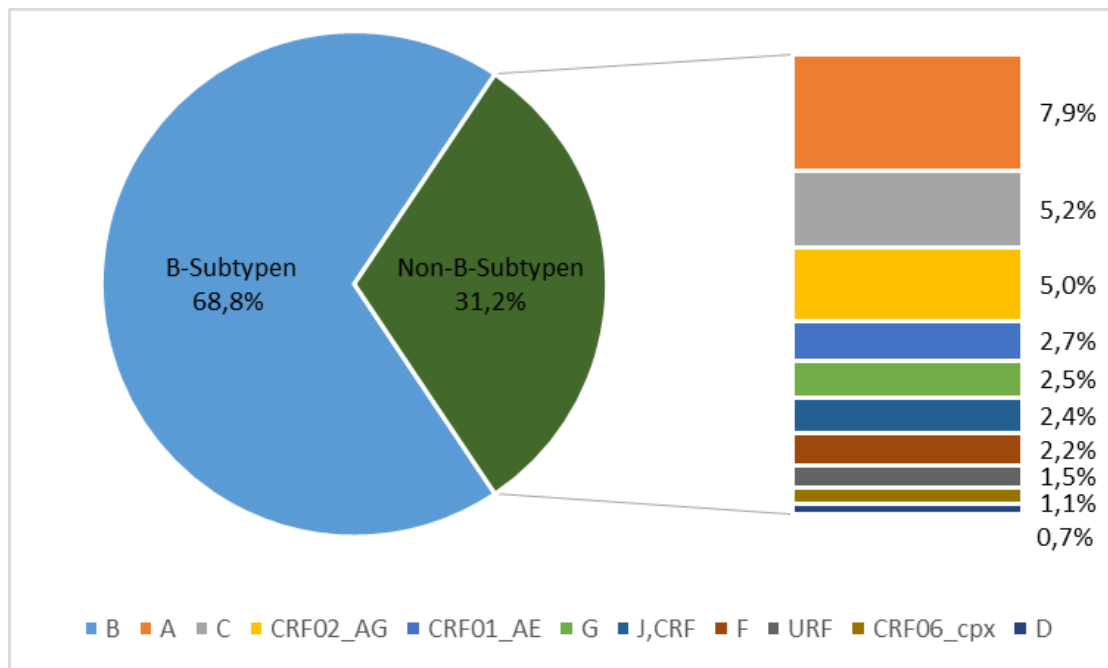


Abbildung 2: Anteil einzelner HIV-1 Subtypen unter den analysierten HIV-Neudiagnosen in Deutschland der Jahre 2013-2016
Quelle: [9]

1.3 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Die älteste, nachweislich bekannte HIV Infektion stammt aus dem Jahre 1959, sie wurde retrospektiv in einer Blutprobe eines Patienten aus Kinshasa (Demokratischen Republik Kongo) identifiziert [10]. Erst im Jahre 1983 konnte das zur Familie der Retroviren gehörende HI-Virus bei AIDS-Patienten isoliert werden [11]. Das HI-Virus gehört zur Gruppe der Lentiviren, welche eine Untergruppe der Retroviren bilden. Reife Virionen haben einen Durchmesser von 100-120 nm und eine charakteristische sphärische Morphologie (Abbildung 3) [12]. Der dicht gefüllte Kern ist umgeben von einer zweischichtigen Phospholipid-Doppelmembran. In diese sind etwa 10 nm große env-Glykoproteinkomplexe eingebettet, welche aus einem externen gp120 und einem internen gp41 Anteil bestehen. Der gp120 Anteil hat mit dem gp41 Anteil eine lose Verbindung, sodass eine spontane Ablösung möglich ist. Die Virushülle enthält darüber hinaus noch weitere Proteine der Wirtszelle, z.B. Adhäsionsproteine ICAM-1, HLA-1, HLA-2 usw. Das konische Nukleokapsid enthält die genomische RNA in Form von zwei identischen Einzelsträngen in Plusstrang-Orientierung, sowie virusspezifische Enzyme. Die

HIV-RNA hat 9 ORFs die für die viralen Gene gag, pol und env, sowie für die Gene der akzessorischen Proteine tat, rev, nef, vif, vpr und vpu kodieren [13].

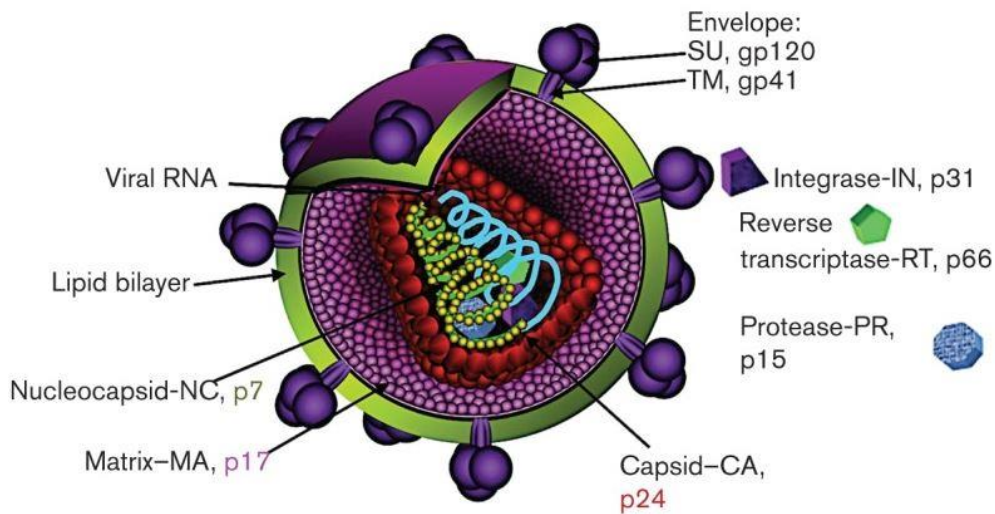


Abbildung 3: Aufbau und Struktur von HIV mit Lokalisierung der Proteine

Quelle: [14].

1.4 Replikationszyklus des HI-Virus

HIV infiziert primär CD4+ Zellen des Immunsystems, darunter befinden sich T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Der Viruseintritt in diese Zellen beginnt mit der Anlagerung des Virions an die Zelloberfläche (Abbildung 4). Mittels Env-Glykoprotein gp120 auf der Zellmembran des Virions wird eine Bindung an den CD4-Rezeptor der Wirtszellen vermittelt. Durch diese Anlagerung erfolgt eine Konformationsänderung, durch die gp120 an einem Co-Rezeptor binden kann. Bei diesem Co-Rezeptor handelt es sich i.d.R. um den Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4. Die Co-Rezeptorbindung erleichtert die Fusion des Virus mit der Zellmembran. Des Weiteren tritt durch die Bindung eine Konformationsänderung des gp41 Proteins ein, welches nun nicht mehr von gp120 verdeckt wird. Dadurch kann die Fusionsdomäne von gp41 mit der Zellmembran in Kontakt treten und die Fusion der Membranen einleiten, die zur Einschleusung des Nucleokapsids ins Zytoplasma der Zelle führt. Dort löst sich das Nucleokapsid teilweise auf und es erfolgt die reverse Transkription der einzelsträngigen, viralen RNA in doppelsträngige DNA unter Bildung des reversen Transkriptionskomplexes. Der

reverse Transkriptionskomplex besteht unter anderem aus den viralen Komponenten der reversen Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN). Die DNA-Doppelstränge werden anschließend in den Nukleus transportiert, in dem mittels der viralen Integrase die Integration ins Wirtsgenom erfolgt. Bei der folgenden Transkription entsteht die virale prä-mRNA, die gespleißt und später auch teilweise ungespleißt in das Zytoplasma transportiert wird. Im Zytoplasma erfolgt die Translation der viralen mRNA, wodurch alle für die Bildung neuer Viruspartikel benötigten Proteine synthetisiert werden. Die Viren gelangen durch Knospung aus der Wirtszelle und reifen durch die Protease zu infektiösen Partikeln heran [11, 13, 15, 16].

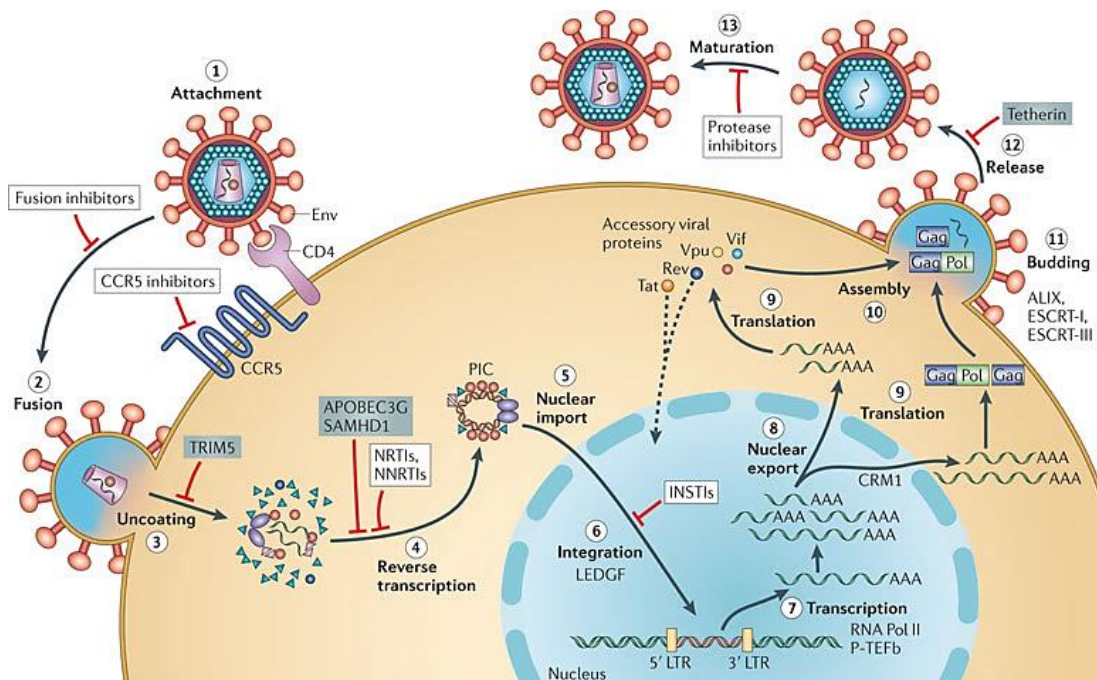


Abbildung 4: Replikationszyklus von HIV und Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente

Bindung an den CD4-Rezeptor und den Co-Rezeptor (1), Fusion des Virus mit der Zellmembran (2), Freisetzung des Virus-Kapsids ins Zytoplasma (3), Reverse Transkription der einzelsträngigen RNA in doppelsträngige DNA (4), Prozessierung des Provirus im Präintegrationskomplex (PIC) durch die Integrase und Transport in den Zellkern (5), Integration ins Wirtsgenom (6), Transkription des Provirus (7), Export ins Zytoplasma (8), Translation (9): mRNA entweder als Matrize für die Translation oder als RNA-Virus-Genom für neue Virus-Partikel, Assemblierung von viralen und zellulären Proteinen (10), Freisetzung der Viruspartikel durch Knospung (11,12), Reifung der Virus-Partikel durch Spaltung der Vorläufer-Polypeptide durch die virale Protease (13). Quelle: [17]

1.5 pol-Genregion

Wie jedes Retrovirus kodiert die HIV RNA für die Genprodukte von *gag*, *pol* und *env*, sowie für weitere akzessorische und regulatorische Proteine (Abbildung 5).

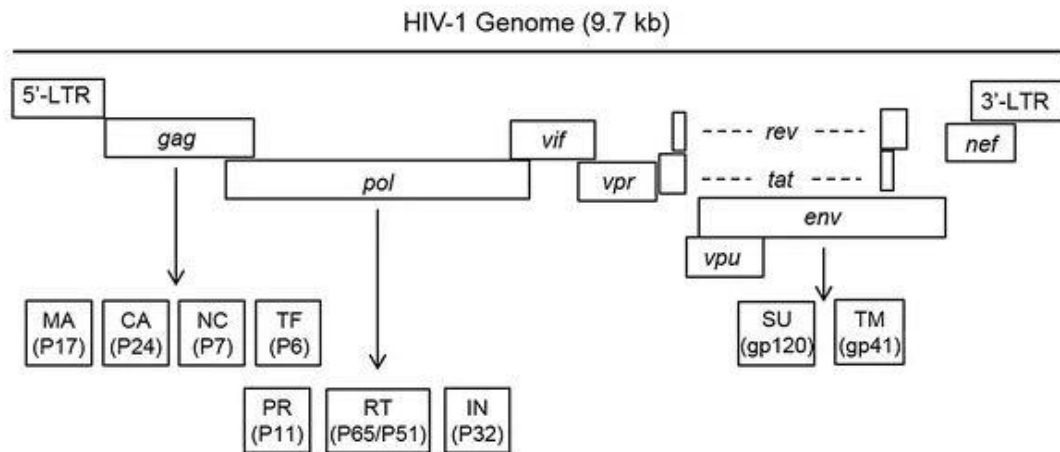


Abbildung 5: HIV-1 Genom

Abgebildet ist die schematische Darstellung des HIV-1-Genoms. Die Untereinheiten der Proteine werden mit dargestellt. Das Molekulargewicht der einzelnen Proteine wird in Klammern angegeben. LTR (Long terminal repeat), Gag (gruppenspezifisches Antigen), MA (Matrixprotein), CA (Kapsidomäne), NC (Nukleokapsid), TF (transframe Protein), Pol (Polymerase), PR (Protease), RT (reverse Transkriptase), IN (Integrase), Env (Hüllprotein), SU (Oberflächenmembranprotein), TM (Transmembranprotein), Vif (viraler Infektionsfaktor), Vpr (virales Protein R), Vpu (virales Protein U), Nef (negativer Regulationsfaktor), Rev (Regulator der Expression viraler Proteine), Tat (Transaktivator der Transkription). Quelle: [18]

Im Bereich des *pol*-Gens liegt die Information für die Enzyme Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) (Abbildung 6).

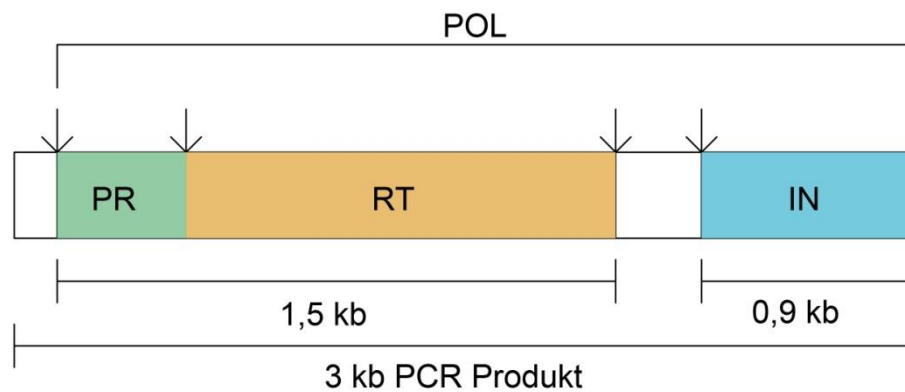


Abbildung 6: Schematische Darstellung der pol-Region des HIV Genoms

Die kodierende Sequenz für Protease und Reverse Transkriptase (PRRT) hat eine Länge von ca. 1500 Basenpaaren (bp) und die Integrase von ca. 900 bp. Das gesamte pol-Genfragment hat somit eine Länge von ca. 3 kb. Die Pfeile zeigen die Schnittstellen der Protease.

1.5.1 Protease

Die HIV Protease wird am 5'-Ende des pol-Gens kodiert. Die aktivierte Protease leitet die hydrolytische Spaltung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen Enzyme und Strukturproteine ein. Die Protease trägt durch die Spaltungsprozesse primär zum Reifungsprozess des Virions und damit zur Entstehung der Infektiösität bei [19, 20].

1.5.2 Reverse Transkriptase

Bevor das virale Genom in das Wirtsgenom integriert werden kann, muss die einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige DNA transkribiert werden. Die Transkription erfolgt durch die reverse Transkriptase, welche eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt. Die RT ist ein Heterodimer mit einer katalytischen 560-Reste-Untereinheit (p66) und einer regulatorischen 440-Reste-Untereinheit (p51) [11, 19, 21-24].

1.5.3 Integrase

Die Integrase (IN) ist ein Schlüsselenzym in der Replikation der HI-Viren und wird ausgehend vom 3' Ende der pol-Region kodiert. Aufgrund ihrer Endonukleaseaktivität kann die Integrase während des Integrationprozesses die provirale DNA

durch Spaltung des DNA-Strangs der Wirtszelle ins Wirtsgenom einbauen. Die Integrase vermittelte Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom lässt sich in vier Stufen einteilen: Bindung, 3`Prozessierung, Strangtransfer und Ligation/Lückenreparatur [25-33].

1.6 Antiretrovirale Therapie

Das Ziel der ART besteht darin, die Viruslast im Patienten unter die Nachweisgrenze zu bringen und gleichzeitig einen Anstieg der CD4 positiven T-Lymphozyten zu bewirken. Die Kombinationstherapie ermöglicht eine dauerhafte Suppression der Virusvermehrung, da essentielle Schritte im Replikationszyklus des Virus durch die Medikamente angegriffen werden. Zentrale Angriffsstellen sind hierbei die viralen Enzyme PR, RT und IN. Dabei stehen unterschiedliche antiretrovirale Substanzklassen zur Verfügung, die in einer Therapie kombiniert eingesetzt werden (Abbildung 7). Die über 20 Medikamente mit einer Wirksamkeit gegen HIV lassen sich in 6 Substanzklassen einteilen:

1. Nukleosidartige Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
2. Nukleotidanalogue Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTIs)
3. Nicht Nukleosidartige Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
4. Protease Inhibitoren (PIs)
5. Integrase-Stranginhibitoren (INIs)
6. Entry Inhibitoren (Eis)

Die ART kombiniert zu Beginn einer HIV-Therapie nach aktuellen Empfehlungen der Deutsch-Österreichischen Leitlinien zur antiretroviralen Therapie einer HIV Infektion, sowie der EACS (European AIDS Clinical Society), zwei Substanzen aus der Klasse der NRTIs mit einem INI [34, 35]. Alternative Kombinationen bestehen aus NRTIs mit NNRTIs oder geboosterten PIs (Abbildung 7). Die Boostierung erfolgt durch gleichzeitige Gabe von Ritonavir oder Cobicistat in niedriger Dosis, welche den Abbau des PIs durch Inhibierung des Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 verlangsamen und dadurch den freien Plasmaspiegel der PIs erhöhen. Da das Virus durch schnelles Mutieren resistente Virusvarianten gegenüber diesen Medikamenten selektieren kann, besteht das Risiko

des Therapieversagens [11, 36-40]. Die kontinuierliche Untersuchung der genetischen Vielfalt von HIV-1 ist von grundlegender Bedeutung bezogen auf die klinische Behandlung von Patienten, um die maximale Effizienz der ART zu gewährleisten [41].

Die INIs sind wesentlicher Bestandteil der ART Kombinationsschemata und haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Um das Risiko eines Therapieversagens zu minimieren ist die Auswahl der richtigen Kombination aus den verschiedenen Medikamenten einer ART von wesentlichem klinischen Interesse. Um die Resistenzanalyse der aktuellen, empfohlenen ART anzupassen, ist es besonders sinnvoll die PRRT und IN Region zusammen zu analysieren.

Kombinationspartner 1		Kombinationspartner 2
<p style="text-align: center;">Nukleosid- /Nukleotidkombinationen empfohlen</p> <p style="text-align: center;">TAF/FTC TDF/FTC ABC/3TC TDF/3TC (+Doravirin)</p> <p style="text-align: center;">Alternative TDF+3TC</p>	+	<p style="text-align: center;">INI empfohlen Dolutegravir Raltegravir Bictegravir (+TAF/FTC)</p> <p style="text-align: center;">NNRTI Empfohlen Doravirin Rilpivirin (+TAF/FTC)</p> <p style="text-align: center;">PI empfohlen Darunavir/r oder Darunavir/c (+TAF/FTC oder ABC/3TC)</p> <p style="text-align: center;">Alternative Dolutegravir/3TC bzw. Dolutegravir+3TC Elvitegravir/c (+TAF/FTC) Atazanavir/r or Atazanavir/c Darunavir/r oder Darunavir/c + TDF/FTC</p>

Abbildung 7: Deutsch-Österreichische Leitlinien zur ART der HIV Infektion Stand 04/2019
 Die Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion beinhalten primär die Kombination von Substanzen aus der Klasse der NNRTIs mit Substanzen der INIs. /c: Cobicistat, /r: Ritonavir; TAF = Tenofovir-Alafenamid, FTC = Emtricitabin, ABC = Abacavir, 3TC = Lamivudin

1.7 Resistenz-assoziierte Mutationen (DRMs)

HIV ist ein RNA-Virus, hier liegt auch die Ursache für das schnelle Mutieren begründet. Der Replikationszyklus von HIV ist abhängig von der Transkription der viralen RNA in provirale DNA. Die RT besitzt keinen Korrekturlesemechanismus, somit werden während der reversen Transkription fälschlich eingebaute Nukleotide nicht entfernt. Dadurch entsteht pro Replikationszyklus ungefähr eine Nukleotidmutation [42, 43]. Bedingt durch die hohe virale Replikationsrate summieren sich die Mutationen schnell, die zum einen zu replikationsunfähigen Mutanten, zum anderen aber auch zu Mutanten mit einer verminderten Empfindlichkeit gegen bestimmte antiretrovirale Substanzen führen. Für diese Viren ergibt sich ein Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp. In der Regel sind die HIV-Infizierten mit einem einzigen oder wenigen Klonen infiziert. Es entstehen bei unbehandelten Patienten täglich schätzungsweise 10^{10} Virionen. Diese führen zu unzähligen Virusvarianten in vitro, diese Virusvarianten werden als Quasispezies bezeichnet [44-46]. Die HIV-1-Quasispezies besitzt eine hohe Rekombinationsrate, die darauf zurückzuführen ist, dass mehrere Virusvarianten dieselbe Zelle infizieren [47, 48].

Man spricht generell von einer Resistenz gegen antiretrovirale Substanzen, wenn die Replikation von HIV in Anwesenheit von Medikamentenspiegeln stattfindet, welche die Replikation eines Referenzstammes (Wildtypvirus) normalerweise hemmen [49]. Bevor es jedoch zu einer umfassenden Resistenz gegen ein oder mehrere Medikamente kommt, bedarf es in den meisten Fällen mehrerer Mutationen. Die Fortsetzung der Therapie, ungeachtet der Resistenzlage, führt schnell zur Selektion resistenter Viruspopulationen [49, 50]. Infizierende Viren können bereits eine oder mehrere Resistenz-assoziierte Mutationen aufweisen, das bedeutet, dass Mutationen die den Resistenzen zugrunde liegen bereits in der vorangegangenen Infektionskette erworben wurden [7]. So kann auch begründet werden, dass klinisch oftmals schon zu Beginn einer Therapie einzelne Substanzen oder ganze Medikamentenklassen eine eingeschränkte oder keine antivirale Wirkung aufweisen [8]. Die Resistenzlage hat unmittelbaren Einfluss auf die klinische Behandlung, so können DRMs (drug resistance mutations) zum einen auch Substanzen der PrEP oder PEP betreffen, als auch eine Änderung der Substanzkombination der ART notwendig werden lassen.

1.8 Resistenztestung

Bedingt durch den weltweiten Zugang von HIV Patienten zu antiretroviralen Medikamenten hat sich die Prognose der Erkrankung, hinsichtlich Morbidität und Mortalität, deutlich gebessert. Das Auftreten von Resistenzen stellt dabei jedoch ein ernsthaftes Problem für den Erfolg der antiretroviralen Therapie dar, da dies häufig zu Therapieversagen mit einem Wiederanstieg der Viruslast führt. Daher wird die Bestimmung der Resistenzsituation bei primärer Infektion, bei chronischer Infektion vor ART-Beginn, bei Therapieversagen und vor ART-Wechsel empfohlen [34]. Die genotypische und phänotypische Resistenztestung ist ein grundlegendes Instrument zur Detektion und Quantifizierung von HIV-1 Resistenzen [51].

1.8.1 Genotypische Resistenztestung

Die genotypische Resistenztestung ist aktuell der Standard zur Beurteilung von bekannten Resistenzmutationen bei HIV infizierten Patienten [52]. Dazu wird die Nukleotidsequenz der pol-Genregion von HIV mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden bestimmt. Der Standardansatz für genotypische Resistenztests ist die direkte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die anschließende Sequenzierung von Dideoxynukleotiden nach Sanger [53]. Die Sequenzierung kann mittlerweile auch durch neue Verfahren in Form von Next-Generation Sequencing (NGS) erfolgen. Im Anschluss werden die Nukleotidsequenzen der ART relevanten Genregionen in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit einer entsprechenden Konsensus-Aminosäuresequenz verglichen. Die ermittelten Mutationen werden mit einem festgelegten „Ein-Buchstaben-Code“ angegeben, dabei steht an erster Stelle die Wildtyp-Referenzaminosäure, danach wird die Aminosäureposition angegeben, gefolgt von der in der Sequenz gefundenen Aminosäuremutation [53]. Die Interpretation der ermittelten Mutationen erfolgt über internationale Datenbanken (z.B. geno2pheno, hiv-grade, Stanford), so wird eine Vorhersage der Resistenzeigenschaften der untersuchten Viren ermöglicht.

Genotypische Resistenztests besitzen eine Sensitivität, die je nach verwendetem Test von 100 bis 1000 Plasma-HIV-1-RNA-Kopien pro ml reicht [54]. Eine Einschränkung besteht in zu niedrigen HIV-1-RNA-Konzentrationen im Plasma, da

genotypische Resistenztests hier nur eine geringe Anzahl zirkulierender Virusvarianten sequenzieren [53].

1.8.2 Phänotypische Resistenztestung

Die phänotypische Resistenztestung basiert auf der Messung der viralen Replikation in Zellkultur. Dabei werden die Viren aus Patientenplasma auf Leukozyten angezüchtet, zusätzlich können diese auch über rekombinante Plasmide mit der zu untersuchenden HIV-1 pol-Genregion modifiziert sein. Die Zellkulturen werden einer steigenden Konzentration an antiretroviralen Medikamenten ausgesetzt, dadurch wird die Resistenz der Viren bestimmt. Für die Durchführung einer phänotypischen Resistenztestung wird in der Regel eine HIV-1-RNA-Plasmakonzentration ≥ 1000 Kopien pro ml benötigt. Phänotypische Tests sind besonders geeignet, um die Sensitivität kürzlich zugelassener antiretroviraler Medikamente zu bestimmen, insbesondere wenn die Resistenzen genotypisch noch nicht ausreichend beschrieben sind. Darüber hinaus besteht die klinische Relevanz darin, die Sensibilität von Viren mit komplexen Mutationsmustern zu bestimmen und eine vorliegende Resistenz direkt in vitro zu erfassen [53, 55].

1.9 Ziel der Arbeit

HIV ist bis heute eine ernst zu nehmende Bedrohung der Gesundheit. Insbesondere die Eindämmung der Krankheit ist global und interindividuell eines der wichtigsten Themen. Um Fortschritte im Zusammenhang mit der Eindämmung der Krankheit zu erreichen, ist die Bereitstellung von adäquaten Therapien von zentraler Bedeutung. Die dadurch erzielte Virussuppression führt zu einem geringeren Infektionsrisiko. Es ist von besonderer Bedeutung, die Resistenzmutationen sofort und präzise identifizieren zu können, um ein Therapieversagen zu verhindern. In diesem Zusammenhang werden genotypische Resistenztests vor Beginn einer Behandlung empfohlen, um klinische Resistenzen vorherzusagen und die Wahl der einzelnen Medikamente zu steuern [35].

In der Routinediagnostik werden die nebeneinander liegenden Gene der Protease und der Reversen Transkriptase gemeinsam amplifiziert und anschließend sequenziert, während die 3' Integrase Region separat analysiert wird.

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Optimierung der Amplifikationsmethode des kompletten HIV-1 pol-Gens, um die PRRT und die IN Regionen zusammen analysieren zu können. Erste Untersuchungen von Ebner et. al. am Institut für Virologie in Düsseldorf konnten eine Amplifikation des kompletten pol-Gens für HIV-1 Zellkulturüberstände etablieren. Bei diesen Versuchen wurde das pol-Fragment des HIV-1 als Ganzes amplifiziert, statt wie bisher in zwei getrennten Reaktionsansätzen.

In dieser Arbeit soll durch die Optimierung des Amplifikationsverfahrens die pol-PCR ausreichend stabilisiert werden, um die Amplifikation des gesamten HIV-1 pol-Fragments subtypunabhängig bei Patienten zu ermöglichen. Dadurch soll eine Etablierung des Verfahrens in der Routinediagnostik ermöglicht werden. Im weiteren Teil der Arbeit wird überprüft, ob das Next-Generation Sequencing Verfahren geeignet ist, um die tatsächliche Zusammensetzung der jeweiligen HIV-1 Quasispezies zu analysieren. Dabei stellt sich die Frage, ob die durch NGS ermittelten prozentualen Häufigkeiten von DRMs auch die prozentuale Verteilung innerhalb der Quasispezies widerspiegeln.

Dazu werden die Ergebnisse des Next-Generation Sequencing der pol-PCR-Produkte mittels der in der Routinediagnostik genutzten Illumina MySeq Technologie mit den Ergebnissen einer klonalen Resistenzanalyse verglichen. Dafür werden pol Fragmente von zehn multiresistenten HIV Subtyp B Virusstämmen mittels „Gibson Assembly“ in einem Klonierungsvektor kloniert und anschließend sequenziert. Im Anschluss wird die Korrelation des Clone-Based Sequencing (CBS) mit den NGS Daten analysiert. Diese Korrelationsanalysen sollen nicht nur zeigen, ob das NGS Verfahren genutzt werden kann, um die HIV Quasispezies widerzuspiegeln, sondern zusätzlich die Untersuchung der Koevolution von Resistenzmutationen in verschiedenen Genregionen ermöglichen. Die Information welche Resistenzmutationen auf gleichen Virusstämmen selektiert werden hilft die tatsächliche Resistenzsituation besser beurteilen zu können und so ggf. eine individualisierte Therapieoptimierung zu ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Bezugsquelle
Accu Block™ Digital Dry Bath	Labnet International
Fluoreszenz-Dokumentationssystem ChemoCam Imager	Intas
Geldokumentation Gel iX20 Imager	Intas
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Mikrowelle Microspeed	Küppersbusch
Netzgerät PowerPac Universal	BioRad
Professional TRIO Thermocycler	Biometra
QIAxcel® Advanced System	Qiagen
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific
Sprout® Mini Centrifuge	Heathrow Scientific
Thermalcycler Mastercycler nexus	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf

Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Vortex Mixer L46	Labinco
Waage JL602G	Mettler Toledo
Zentrifuge 3K30	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf
Impfnadel, 200 mm, steril	Greiner Bio-One
PCR Tube Strips 0,2 ml	Eppendorf
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt
TipOne® Filter Tips 10/20 µl	Starlap
TipOne® Filter Tips 20 µl	Starlap
TipOne® Filter Tips 200 µl	Starlap
TipOne® Filter Tips 1000 µl	Starlap

Tube 13 ml, 100 x 16mm

Sarstedt

QX 0,2ml 12-Tube-Strips

Qiagen

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarose	Biozym
Ampicillin (100mg/ml)	Roche
Ethanol	Merck
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Roth
MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Puffer und Lösungen

2x Reaction Mix (0,4 mM dNTP, 3,2 mM MgSO ₄)	Thermo Fisher Scientific
TBE Puffer (10x)	Sigma (Aldrich)
Wasser – Elix H ₂ O Aufbereitungssystem	Merck Millipore
6 x Ladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin)	Roth

2.1.5 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Bezugsquelle
LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml)	Virologie Düsseldorf
LB-Medium	Roth

2.1.6 Größenstandard

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 HIV-1 Proben

Die HIV-1 Plasma Proben zur Gewinnung der pol-Produkte entstammen der RESINA-Studie (Referenznummer: 2014042307, Ethikvotum 01.12.2014).

2.1.8 Primer

Sämtliche Primer wurden von den Firmen Metabion, Steinkirchen oder Eurofins Genomics, Ebersberg bezogen. Sofern nicht anders erläutert, wurden die Primer in dieser Arbeit in einer Konzentration von 10 µM verwendet.

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
5220as (rev Primer)	CCCTAGTGGGATGTGTA CTCTGA
PRRT-nonB-F (fw Primer)	GCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATG
2001s (fw Primer)	TGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTT
3p31 (rev Primer)	ATCCTGTCTACYTGCCACACAA
5`INT (fw Primer)	ATTGGAGGAAATGAACAAGT
pUC18-HIV-Pol-F	TTGTGTGGCARGTAGACAGGATGGATC CCCGGGTACCGAGCT
pUC18-HIV-Pol-R	AACAGCCCTTTTTCTAGGGGCCCTGCA TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGC
Seq A	GAGCCAACAGCCCCACC
Seq B	CAATGGCCATTGACAGAAG
Seq E	GGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGA

2.1.9 pUC18 Plasmid

Für die Klonierung wurde das Plasmid pUC18, aus dem Gibson Assembly™ Cloning Kit, in einer Konzentration von 25 ng verwendet.

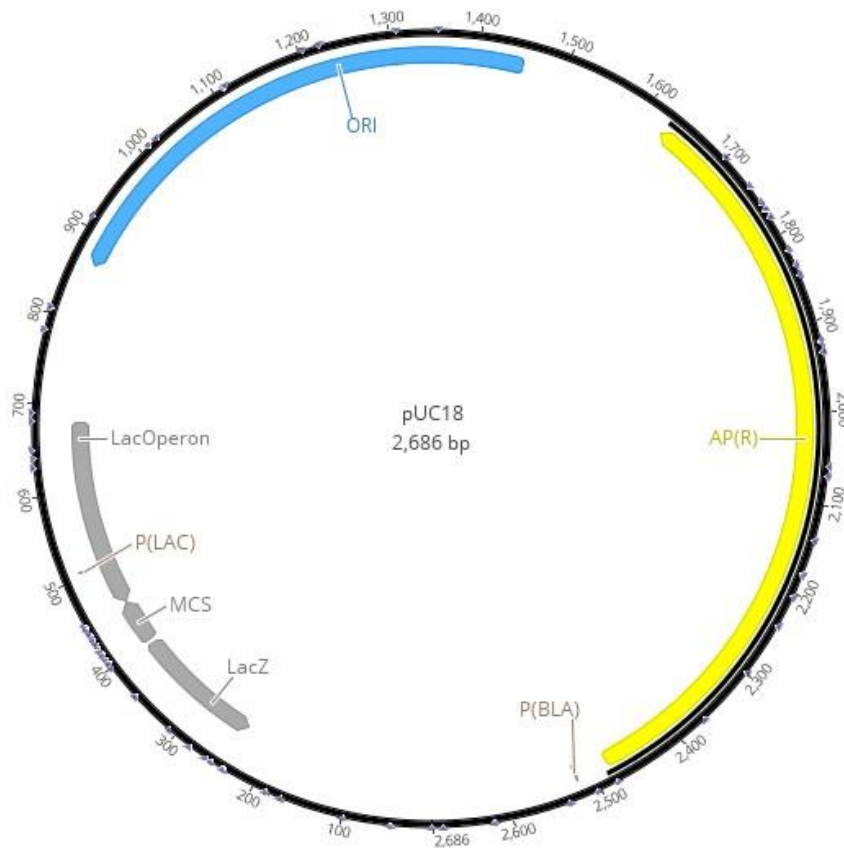


Abbildung 8: pUC18 Vektorkarte

Der verwendete pUC18 Vektor ist ein E. coli Plasmid mit einer Länge von 2686 bp. Er enthält identische multiple Klonierungsstellen, sowie ein Ampicillinresistenzgen zur positiv Selektion transformierter Bakterien. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software Geneious erstellt.

2.1.10 Zellen

NEB-5-alpha: Chemisch kompetenter E.coli Stamm, Genotyp: fhuA2 Δ (arg-FlacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 aus dem Gibson Assembly™ Cloning Kit, Bestellnummer: C2987.

2.1.11 Enzyme

Bezeichnung/Sequenz	Bezugsquelle
Bgl I (GCCNNNN/NGGC)	New England Biolabs
Dpn I (GA/TC)	New England Biolabs
Platinum® Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Superscript™III RT/Platinum™ Taq Mix	Thermo Fisher Scientific
T4 Gene 32 Protein	New England Biolabs

2.1.12 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Gibson Assembly™ Cloning Kit	New England Biolabs
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Invitrogen SuperScript®III One Step RT-PCR System mit Platinum® Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion

Die Extraktion der viralen RNA erfolgte automatisiert mittels EZ1 Plattform unter Verwendung des EZ1 Virus Mini Kits v2.0 (Qiagen). Dabei wurden 200 µl Plasma eingesetzt und in 60 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C.

2.2.2 HIV-1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Die HIV-1 PCR findet in zwei Schritten statt. Zuerst wird in einer RT-PCR durch einen vorgeschalteten reverse Transkriptionsschritt die HIV-1 RNA mithilfe von Primern in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und vervielfältigt. In der darauffolgenden Nested PCR wird die cDNA weiter vervielfältigt. Jede PCR beinhaltet die Schritte Auftrennung des DNA-Doppelstranges, Anlagerung der Primer an den Einzelstrang, Verlängerung und Bildung eines komplementären Stranges. Mittels der PCR wurde das pol-Gen zunächst in DNA konvertiert und schließlich in einen Expressionsvektor zur Sequenzanalyse kloniert.

2.2.3 RNA-Präinkubation

Bei der RNA-Präinkubation wurden die Primer der RT-PCR mit der RNA in einem separaten Cyclerprogramm präinkubiert, auf Eis können fakultativ Enzyme hinzugefügt werden.

Tabelle 1: RNA-Präinkubation

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus:	Funktion
65	5:00	1x	RNA-Präinkubation
Auf Eis	1:00	-	Zugabe von T4gp32 (siehe 3.2)
25	5:00	-	-

2.2.4 RT-PCR

Die Amplifikation des HIV-1 pol-Gens wurde mit einer One-Step RT-PCR unter Verwendung des Superscript III One-Step RT-PCR-Kits (Invitrogen) durchgeführt. Die verwendeten RT-PCR-Primer sind 5220as und PRRT-nonB-F (siehe 2.1.8 Primer).

RT-PCR-Reaktion, 50 µl Ansatz:

Tabelle 2: Ansatz für RT-PCR

Reagenzien	Konzentration [µM]	Volumen [µl]
2x Superscript III Reaktionspuffer Mix		25
Nuclease freies Wasser		12
Fw-Primer	10	1
Rev-Primer	10	1
SuperScript III Enzymmischung		1
HIV-RNA		10

Die RT-PCR wurde mit einem Thermocycler von Eppendorf unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Tabelle 3: RT-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
50	30:00	1x	Reverse Transkription
95	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	10 x	Denaturierung der DNA
65-55 ($\Delta T = -1 \text{ }^\circ\text{C}$)	0:45		Primerhybridisierung
68	4:30		DNA-Synthese
94	0:30	30 x	Denaturierung der DNA
55	0:45		Primerhybridisierung
68	4:30		DNA-Synthese
68	5:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

2.2.4.1 Nested PCR

Um ausreichend PCR-Produkt für eine Sequenzierung zu generieren, wurde der RT-PCR eine zweite (nested) PCR angeschlossen. Dabei wurden je Probe 5 μl , der zuvor im Rahmen der RT-PCR vervielfältigten viralen DNA, in einen neuen Ansatz von 45 μl überführt.

Der Ansatz wurde unter Verwendung des Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kits wie folgt angesetzt:

Tabelle 4: Ansatz für Nested-PCR

Reagenzien	Konzentration [μM]	Volumen [μl]
10x Reaktionspuffer		5
Nuclease freies Wasser		35,3
MgCl_2	50000	1,5
dNTP`s	10000	1
Fw-Primer	10	1
Rev-Primer	10	1
Platinum Taq		0,2
HIV-RNA aus RT-PCR		5

Die Nested-PCR wurde mit einem Thermocycler von Eppendorf unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Tabelle 5: Nested-PCR

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
95	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	10 x	Denaturierung der DNA
65-55 ($\Delta T = -1^{\circ}\text{C}$)	0:45		Primerhybridisierung
72	4:30		DNA-Synthese
94	0:30	30 x	Denaturierung der DNA
55	0:45		Primerhybridisierung
72	4:30		DNA-Synthese
72	10:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Lagerung

2.2.5 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ist ein Trennverfahren, welches nach dem Prinzip einer Elektrophorese funktioniert. Diese wurde mit dem QIAxcel® Advanced System der Firma Qiagen durchgeführt.

Es wurde jeweils 10 µl der zu analysierenden Proben in QX 0,2ml 12 Tube Strips überführt. Leere Tubes des 12-Tube-Strips wurden wiederum mit QX DNA Dilution Buffer befüllt. Die Elektrophorese findet in dünnen, mit Puffer gefüllten Glaskapillaren statt. Mittels hydrodynamischer Injektion werden wenige Nanoliter der jeweiligen Probe in das Kapillarröhrchen verbracht. Durch die Anlegung einer elektrophoretischen Spannung erfolgt die Ionenwanderung der negativ geladenen DNA von der Kathode in Richtung Anode. Die DNA-Moleküle werden photometrisch detektiert, deren Größe mithilfe eines internen Standards (Marker) bestimmt und über die QIAxcel® ScreenGel® 1.5.0 Software ausgewertet. Die Software zeigt das Ergebnis der Kapillarelektrophorese in Banden an und liefert ebenfalls die Basenpaargröße der DNA Fragmente, sowie deren Konzentration in ng/µl.

2.2.6 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung der pol-PCR-Produkte, erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers [56]. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl EB-Puffer eluiert und die Konzentration am Nanodrop gemessen.

2.2.7 NanoDrop Konzentrationsmessung

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen. Der NanoDrop 2000 ist ein Vollspektrum-Spektrophotometer zur Messung der Extinktion von DNA, RNA, Protein und Farbstoff. Es kann ein Spektrum von 220 bis 750 nm automatisch messen und graphisch darstellen. Die Spektralmessung erfolgt mit zwei installierten Lichtwellenleitern (Licht aus einer Xenonlampe) und dem Probenarm (Spektrometer mit linearer CCD-Anordnung). Mit dem NanoDrop 2000 Messsystem kann DNA, RNA, Protein oder

Farbstoff schon bei einer geringen Menge von 0,5 - 2,0 μl Volumen, ohne Küvetten oder Kapillaren, gemessen werden. Zur Bewertung der Reinheit von DNA wurde die DNA-Konzentration im Verhältnis zur optischen Dichte gleichzeitig berechnet, dabei wird zwischen der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 230 nm und 280 nm verglichen [57]. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte bei Werten zwischen 1,9 - 2,1 liegen, der Absorptionsquotient A_{230}/A_{280} bei 1,8 - 2,2.

Eine optische Dichte von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Die OD 280 gibt Auskunft über die Verunreinigung mit Proteinen, die OD 230 gibt Auskunft über Verunreinigungen mit organischen Verbindungen.

2.2.8 Q5-Polymerisation

Zur Sequenzanalyse werden die zuvor amplifizierten pol-Fragmente in den pUC18 Vektor kloniert. Dazu werden in den Vektor mittels einer PCR zunächst Bindungsstellen eingefügt, die komplementär zu den in der pol-PCR verwendeten Primern 2001s und 3p31 sind. Da diese Sequenzen das pol-Fragment flankieren, können Sie so mittels Gibson Assembly in den puC18 Vektor eingebracht werden. Zur Reduktion von Replikationsfehlern, wird in dieser PCR die Q5-Polymerase genutzt, die zusätzlich eine „Proofreading“- Aktivität besitzt.

Der Ansatz für die Q5-Polymerisation setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 6: Ansatz für Q5-Polymerisation

Reagenzien	Konzentration [μM]	Volumen [μl]
Nuclease freies Wasser		33
5x Q5 Puffer		10
dNTP`s		1
pUC18-HIV-Pol-F Primer (+ Primer)	10	2,5
pUC18-HIV-Pol-R Primer (- Primer)	10	2,5
Q5 Polymerase		0,5
pUC18 Vector (1:10)		0,5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Tabelle 7: Q5-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
98	1:00	1 x	Öffnung pUC18 Vector, DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
98	0:20	41 x	Denaturierung der DNA
72	2:30		DNA-Synthese
72	10:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

Im Anschluss wurde der pUC18 Ursprungsvektor mit 1 µl des Enzyms Dpn I für 30 min bei 37°C verdaut. Das Enzym Dpn I erkennt die Methylierung und baut dadurch ungeöffnete Ursprungsvektoren ab, sodass lediglich PCR-Produkte übrig bleiben. Nach dem Dpn I Verdau erfolgte eine Größenkontrolle des PCR-Produktes durch die Kapillarelektrophorese mit dem QIAxcel. Es wurde für alle Versuche eine 1:10.000 Verdünnung der pUC18 Stock-Lösung eingesetzt.

2.2.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung des PCR Produktes des pUC18 Vektors erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers [56]. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl EB-Puffer eluiert und die Konzentration mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen. Bei der 1:10.000 Verdünnung lag pUC18 in einer Konzentration von ca. 100 ng/µl vor.

2.2.10 Ligationsberechnung

Um die Klonierung von pUC18 Vektor mit dem Insert (HIV-1 pol-Fragment) mittels Gibson Assembly (siehe 2.2.11) durchzuführen, wurde die benötigte Menge

an Insert unter Anwendung des Tools http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html berechnet. Die Parameter waren wie folgt:

Vectorsize (pUC18 Vektor): 2800 bp

Vectoramount: 100 ng

Insertsize: 3100 bp

2.2.11 Klonierung mit „Gibson Assembly“

Der „Gibson Assembly“ ist eine Variante der isothermalen DNA Amplifikation, welche zur Klonierung verwendet werden kann. Dabei werden drei enzymatische Schritte in einem Puffer durchgeführt. (1) Die T5-Exonuklease verdaut die 5` Enden des DNA Doppelstranges, sodass an den Enden „sticky ends“ entstehen. Diese ermöglichen die Anlagerung von komplementären DNA Strängen. (2) Eine DNA Polymerase füllt die Lücken zwischen den zusammengelagerten Fragmenten auf. (3) Nun erfolgt die Verbindung der freien 5`-Phosphatgruppen mit den 3`-Hydroxylgruppen über eine Taq-DNA-Ligase [58].

Nach diesem Prinzip wurde in dieser Arbeit der durch die Q5-Polymerase geöffnete (siehe 2.2.8) und aufgereinigte (siehe 2.2.9) pUC18 Vektor mit den entsprechenden aufgereinigten HIV-1 pol-Fragmenten der zu untersuchenden Patientenproben ligiert. Dazu wurde die DNA im molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 vermischt und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Dann wurde 10 µl Gibson Assembly 2x Mastermix hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für zwei Stunden bei 50°C inkubiert.



Abbildung 9: Gibson Assembly

Schematische Darstellung der isothermalen DNA-Amplifikation nach Gibson unter Anwendung der enzymatischen Schritte 1) Digestion und Annealing, 2) Polymerisation und 3) Ligation.

2.2.12 Bakterientransformation

Die Transformation des mit dem HIV-1 pol-Fragment klonierten pUC18 Vektors (siehe 2.2.11) in kompetente NEB-5-alpha Bakterien erfolgte durch Bakterientransformation nach dem folgenden Schema. Zuerst wurde 5 µl des mittels Gibson Assembly klonierten Vektorproduktes zu 50 µl der NEB-5-alpha Bakterien gegeben. Das Vektor-Bakteriengemisch wurde für 20 Minuten auf Eis gelagert, um die Bakterien mit dem Vektor zu transformieren. Zur Effizienzerhöhung dieses Schrittes wurde das Gemisch für 30 weitere Sekunden bei 42 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend erfolgte wiederum für fünf Minuten eine Kühlung auf Eis, um das Schließen der Bakterienmembran zu ermöglichen. Danach wurde 480 µl S.O.C. Outgrowth Medium hinzugegeben und bei 37 °C und 600 rpm für eine Stunde im Thermocycler inkubiert. Zum Schluss wurde das Medium mit den so transformierten Bakterien auf einer LB Ampicillin-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und für mindestens 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Bakterienkultur

Zur Plasmidisolierung wurden Bakterienflüssigkulturen im „Mini“-Maßstab angezchtet. Dazu wurden Einzelkolonien (siehe 2.2.12) in LB-Flüssigmedium, das mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war, überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.14 Mini-Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen des klonierten pUC 18 Vectors mit pol-Insert erfolgte mit dem „QIAPrep Spin Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers [59]. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden 4 ml Flüssigkultur anstelle von 2 ml präpariert. Die aufgereinigte DNA wurde in 40 µl Wasser eluiert und die Konzentration mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen.

2.2.15 Analytische Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle der erfolgreichen Insertion des pol-Fragmentes in die pUC18 Vektoren, erfolgte eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Bgl I. Dazu wurde ein 20 µl Restriktionsansatz mit 12,5 µl Wasser, 2 µl Puffer 3.1 und 0,5 µl Bgl I hergestellt. Danach wurde jeweils 5 µl der aufgereinigten Plasmid-DNA (aus 2.2.14) mit 15 µl Mastermix in einem 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube vermischt und für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Das Enzym Bgl I schneidet den pUC18 Vektor an den Basenpositionen 252 und 1820. Dadurch entstehen zwei Fragmente die eine Länge von 1118 bp und 1568 bp haben. Wenn das HIV-1 pol-Fragment mit einer Länge von ~2900 bp erfolgreich in den Vektor eingebaut wurde, entstehen zwei Fragmente mit einer Länge von 1118 bp und ~4468 bp. Somit konnte die Restriktionsanalyse mit Bgl I mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet werden (siehe 2.2.16).

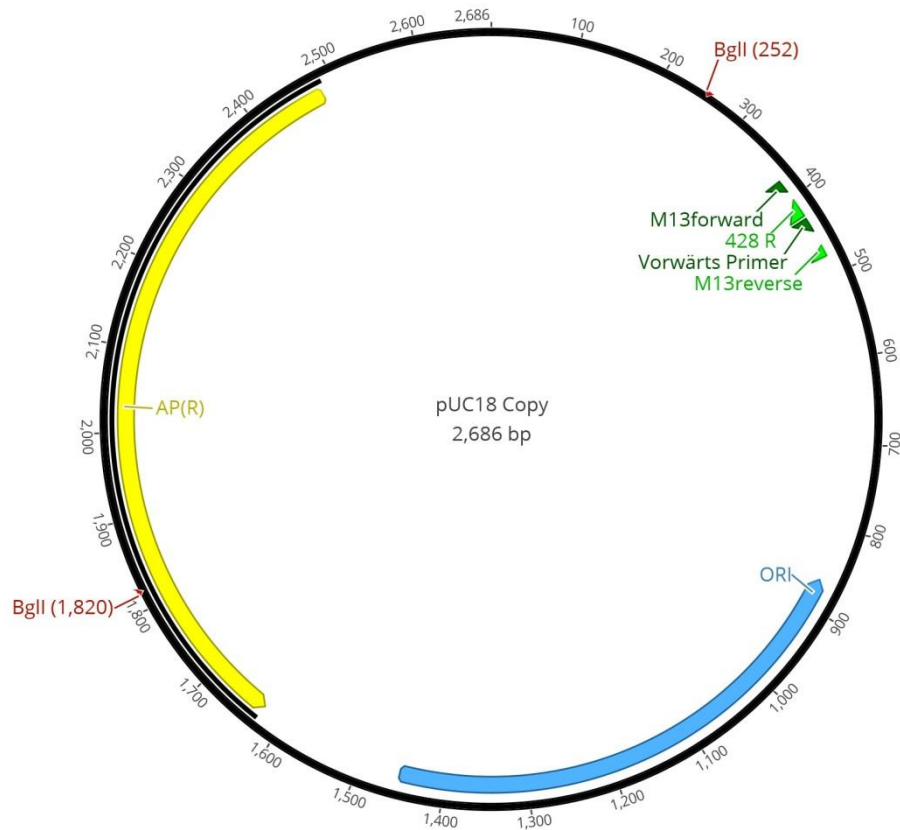


Abbildung 10: Bgl I-Schnittstellen im pUC18 Vektor

Die Schnittstellen des Restriktions-Enzyms Bgl I (rot) befinden sich an Position 252 und 1820. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software Geneious erstellt.

2.2.16 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode um Nukleinsäuren (RNA oder DNA) durch elektrische Spannung nach ihrer Größe aufzutrennen.

Zur Herstellung eines 0,8 % Agarosegels wurde 0,4 g Agarosepulver auf 50 ml 1 x TBE-Puffer gegeben und dieses durch Erhitzung in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde dem Gemisch 2 Tropfen 0,025 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung zugefügt und dann in den mit Kamm präparierten Gelelektrophoreseschlitzen gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit 1 x TBE-Puffer befüllt und der Kamm entfernt. Die dadurch entstandenen Geltaschen wurden mit den DNA-Proben beladen. Diese wurden zuvor mit einem 6 x Ladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin) vermischt, im Verhältnis 5 µl

DNA-Probe auf 1 μl 6 x Ladungspuffer. Je Geltasche wurde 5 μl DNA-Probe pipettiert. Zur Größenkontrolle wurden in eine seitliche Geltasche 2 μl des Längenmarkers „GeneRuler™ Ladder Mix“ aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung von 70 mA für einen Zeitraum von 50 Minuten. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentations-Systems „Gel iX20 Imager“ unter UV-Licht abgelichtet und über die Software „Fluoreszenz-Dokumentationssystem ChemoCam Imager“ ausgewertet. Die Fragmentgröße wurde anhand des mitgelaufenen Längenmarkers ermittelt.

2.2.17 Sanger-Sequenzierung

Sanger-Sequenzierungen von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg durchgeführt. Dazu wurden die Proben zur Sequenzierung zuvor auf ein „PlateSeq Kit DNA“ Kit aufgetragen. Zur Sequenzierung enthielten die Platten gemäß den Angaben von Eurofins ausreichende Mengen Primer und DNA.

Die durchgeführte Sanger-Sequenzierung basiert auf der von Sanger und Coulson 1977 veröffentlichten Sequenziermethode, die auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet wird [60]. Bei der weiterentwickelten Sanger-Sequenzierung läuft die Sequenzierung des Matrizenstranges über einen 5' zu 3'Primer (DNA-Polymerase) in einem Reaktionsgefäß ab.

Im Reaktionsgefäß befinden sich neben Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und der DNA-Polymerase, vier farblich unterschiedlich, fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs). Die DNA-Polymerase verlängert die denaturierten DNA-Einzelstränge mittels der dNTPs bis es zum Einbau eines ddNTPs kommt, dieses erzeugt über seine nicht vorhandene 3'-Hydroxygruppe einen Kettenabbruch. Die nun entstandenen Produkte werden mit einem Kapillarelektrophoreseverfahren aufgetrennt und parallel dazu werden die eingebauten ddNTPs an den Enden zur Fluoreszenz angeregt und detektiert. Aus der Abfolge der Farbsignale ergibt sich die direkte Basenabfolge des DNA-Matrizenstranges [61-63].

2.2.18 Next-Generation Sequencing Methoden

Die Next-Generation Sequencing Methoden wurden erstmals 2005 als Alternative zur Sanger Sequenzierung verwendet [64]. Zur Zeit gibt es zahlreiche unterschiedliche Methoden unter anderem: Helicos Heliscope, Applied Biosystems SOLiD System, 454 Life Sciences (Roche), Complete Genomics, Pacific Biosciences, Life Technologies Ion Torrent, Pac Bio, Illumina und das oftmals als Sequenzierung der dritten Generation bezeichnete single molecule real-time (SMRT) system (MinION) von Oxford Nanopore [65]. Für diese Arbeit wurde die Illumina MiSeq Technologie als Verfahren verwendet, welche im weiteren Verlauf detaillierter beschrieben wird.

Die unterschiedlichen Methoden, ausgenommen der MinION Technologie, haben mit verschiedenen Ansätzen das gemeinsame Ziel einzelne DNA-Stränge in gleichzeitigen und parallel ablaufenden Prozessen zu amplifizieren, wodurch eine Fragmentsammlung erzeugt wird. Im Anschluss kann diese dazu verwendet werden Sequenzreaktionen auf den Strängen der Fragmentsammlung stattfinden zu lassen. Durch die Verwendung von Adaptersequenzen kann die Sequenzierung selektiv über eine PCR erfolgen und es ist im Gegensatz zur Sanger Sequenzierung kein bakterieller Klonierungsschritt mehr nötig. Die NGS Methoden basieren dabei auf einer dreiteiligen Reaktionsreihe bestehend aus Nukleotidadditionsschritt, Nachweis der eingebauten Nukleotide und Waschschrift zur Entfernung der fluoreszierenden Markierungen. Sie erzeugen große Datensätze, da die Instrumente der unterschiedlichen Systeme enorme Kapazität besitzen [66, 67].

2.2.18.1 Illumina Technologie

Die Amplifizierung und gleichzeitige Sequenzierung mittels Illumina MiSeq Technologie gehört zu den NGS Methoden. Dabei werden spezifische Adapter an beide Enden der zu amplifizierenden DNA Fragmente gebunden. Auf einer mehrkanaligen, gläsernen Durchflusszelle befindet sich eine oligo-derivatisierte Oberfläche. Diese ermöglicht, vermittelt durch eine DNA-Polymerase, im nächsten Schritt eine Bindung der Fragmente und anschließende Brückenamplifikation von einzelnen Molekülen, welche in zahlreichen DNA-Kopien vervielfältigt werden. Jede Ansammlung von Adaptern erzeugt über diese Art der Amplifikation der

Ausgangs-DNA ein Cluster, bestehend aus ca. 1 Millionen Kopien des ursprünglichen Fragments. Das Illumina-System verwendet einen „Sequenzierung-durch-Synthese-Ansatz“, dabei werden alle vier Nukleotide (mit den Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) zeitgleich in die Fragmentcluster auf der Durchflusszelle eingebaut. Die Nukleotide besitzen eine spezifische Fluoreszenzmarkierung an den Basen, während gleichzeitig die 3`-OH-Gruppe blockiert ist. Bei jedem Baseneinbau erfolgt eine optische Bildgebung, bevor die 3`-blockierende Gruppe wieder entfernt wird und ein weiterer Nukleotideinbau in den Strang ermöglicht wird. In sich wiederholenden Zyklen können so Sequenzen gewonnen werden, welche mit zugehörigen Qualitätswerten verglichen und modifiziert werden [67, 68].

3 ERGEBNISSE

Der Fokus der Arbeit lag auf der Entwicklung einer Subtyp-unabhängigen All-in-one PCR der gesamten pol-Gen-Region von HIV-1. Die Amplifikation der pol-Genregion sollte im weiteren Verlauf einen Vergleich von resistenten HIV-1 pol Varianten mittels Next-Generation Sequencing (NGS) und Clone-Based Sequencing (CBS) ermöglichen.

Dabei sollte geklärt werden, ob die durch NGS ermittelte prozentuale Häufigkeit von DRMs mit der prozentualen Häufigkeit der klonalen Resistenzanalyse vergleichbar ist.

3.1 Optimierung der pol-PCR

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Amplifikationsmethode des kompletten HIV-1 pol-Gens zu optimieren, indem das pol-Fragment des HIV-1 als Ganzes amplifiziert werden sollte, statt wie bisher in zwei getrennten Reaktionsansätzen. Bisher konnte bereits eine All-in-one-PCR des HIV-1 pol-Fragments etabliert werden, diese PCR zeigte sehr gute Resultate bei HIV-1 Zellkulturüberständen. Bei Patientenproben mit niedrigen Viruslasten erbrachte die bereits etablierte PCR nicht die gewünschten Ergebnisse.

Zur Optimierung wurden zwei unterschiedliche PCR-Protokolle definiert, die beide aus einer einstufigen RT-PCR mit anschließender Nested PCR bestanden. Das Protokoll I basierte auf den Ergebnissen der bereits etablierten HIV-1 pol-PCR. Im Protokoll II wurden unterschiedliche Parameter zu Optimierung der Reaktionsbedingungen angepasst. Die Anpassung des Protokolls sollte die PCR-Reaktion stabilisieren, da bisher insbesondere aufgrund der großen Fragmente und der unterschiedlichen Subtypen und Viruslasten nicht die erwünschten Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Amplifikation des HIV-1 pol-Gens, welche die Gene Protease, Reverse Transkriptase, RNAse H und Integrase kodiert, hat eine zu erwartende Produktgröße von 2843 bp. In Abhängigkeit von der Virusvariante und dem HIV-1 Subtyp kann die Produktgröße leicht variieren.

Tabelle 8: Protokoll I RT-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
x	30:00	1x	Reverse Transkription
95	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	10 x	Denaturierung der DNA
65-55 ($\Delta T = -1 \text{ }^\circ\text{C}$)	0:45		Primerhybridisierung
68	4:30		DNA-Synthese
94	0:30	30 x	Denaturierung der DNA
55	0:45		Primerhybridisierung
68	4:30		DNA-Synthese
68	5:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

Tabelle 9: Protokoll I Nested-PCR

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
95	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	10 x	Denaturierung der DNA
65-55 ($\Delta T = -1 \text{ }^\circ\text{C}$)	0:45		Primerhybridisierung
72	4:30		DNA-Synthese
94	0:30	30 x	Denaturierung der DNA
55	0:45		Primerhybridisierung
72	4:30		DNA-Synthese
72	10:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

Im Protokoll I (Tabelle 8 und 9) wurde ein Touch-Down eingebaut, der die Temperatur in den ersten 10 Zyklen der Primerhybridisierung jeweils um $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ je Zyklus von $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ absinken lies.

Tabelle 10: Protokoll II RT-PCR

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
x	30:00	1x	Reverse Transkription
94	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	40 x	Denaturierung der DNA
65	0:30		Primerhybridisierung
68	4:30		DNA-Synthese
68	5:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

Tabelle 11: Protokoll II Nested-PCR

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]	Zyklus:	Reaktion
94	2:00	1 x	DNA-Denaturierung, Taq-Polymerase Aktivierung
94	0:30	40 x	Denaturierung der DNA
65	0:30		Primerhybridisierung
72	4:30		DNA-Synthese
72	5:00	1x	Synthese
10	Pause	-	Reaktionsstop

Im Protokoll II (Tabelle 10 und 11) wurde auf diesen Touch Down verzichtet, so dass alle 40 Zyklen der Primerhybridisierung konstant bei 65°C erfolgten. Um die gewünschten Produktgrößen zu erhalten, wurde zur weiteren Optimierung eine RNA-Präinkubation ausgetestet. Des Weiteren wurden unterschiedliche Temperaturen für den reversen Transkriptions-Schritt ausgetestet, um die Amplifikation zu optimieren. Sofern nicht zusätzlich aufgeführt, waren alle Positivkontrollen der PCRs positiv und alle Negativkontrollen negativ.

3.1.1 HIV-1 Subtyp B

Der HIV-1 Subtyp B der Gruppe M ist der in Europa am weitesten verbreitete HIV-1 Subtyp. Zu Beginn der Arbeit wurde deshalb der Schwerpunkt auf die Subtyp B PCR gelegt, indem gezielt Subtyp B Proben zur PCR Etablierung ausgewählt wurden.

Zur Optimierung der pol-PCR wurde in einem ersten Versuch, die RT-PCR ohne Touch-Down und ohne RNA-Präinkubation durchgeführt. Basierend auf bisherigen Protokollen wurde die Temperatur im RT-Schritt mit 50°C gewählt. Für die gewählten B-Subtypen konnte nur bei einer der sechs getesteten Plasmaproben eine spezifische Produktamplifikation erzielt werden (Linie 4, Abbildung 11). Bei den anderen untersuchten Plasmaproben resultierte die unmodifizierte RT-PCR in unspezifischen PCR-Produkten.

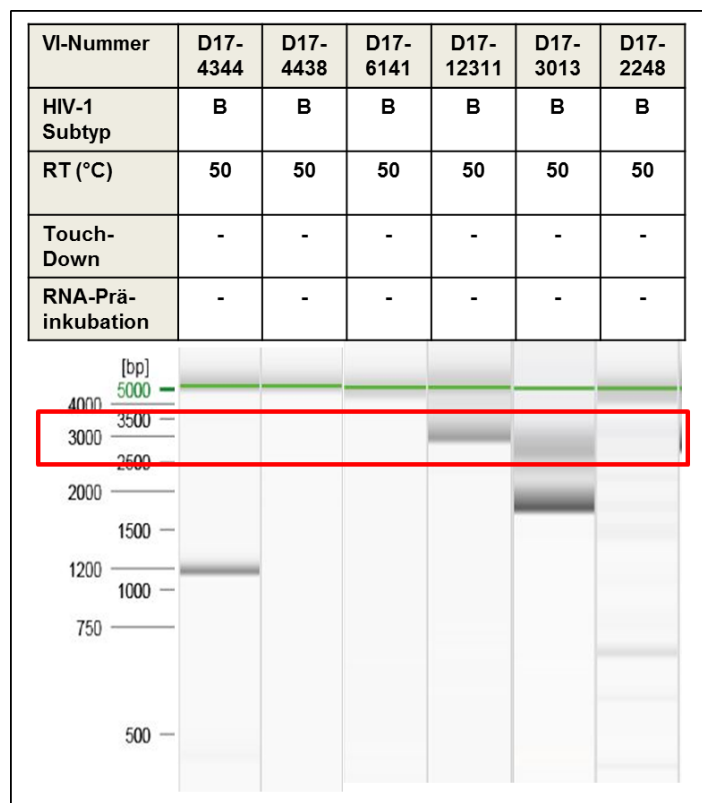


Abbildung 11: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 B-Subtypen nach RT-Schritt bei 50°C

Die RT-PCR der HIV-1 pol-Gens von Subtyp B Proben erfolgte unter den angegebenen PCR-Bedingungen (Tabelle 10 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese dargestellt.

Im durchgeführten Protokoll der pol-PCR entstanden weitestgehend unspezifische PCR-Produkte. In den ersten Protokollmodifikationen zeigte sich ansatzweise, dass diese unspezifischen Nebenbanden durch eine RNA-Präinkubation reduziert werden können. Um der Frage nachzugehen, ob diese unspezifischen PCR-Produkte durch eine unspezifische Primer-Bindung oder durch RNA-Sekundärstrukturen induziert werden, wurde ein Produkt von 788 bp mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierung zeigte, dass innerhalb des PCR-Produktes eine Deletion vorlag, welches nicht auf eine unspezifische Primerbindung, sondern auf Sekundärstrukturen bzw. sterische Hindernisse der Polymerase während des Amplifikationsprozesses hindeutet (Abbildung 12).

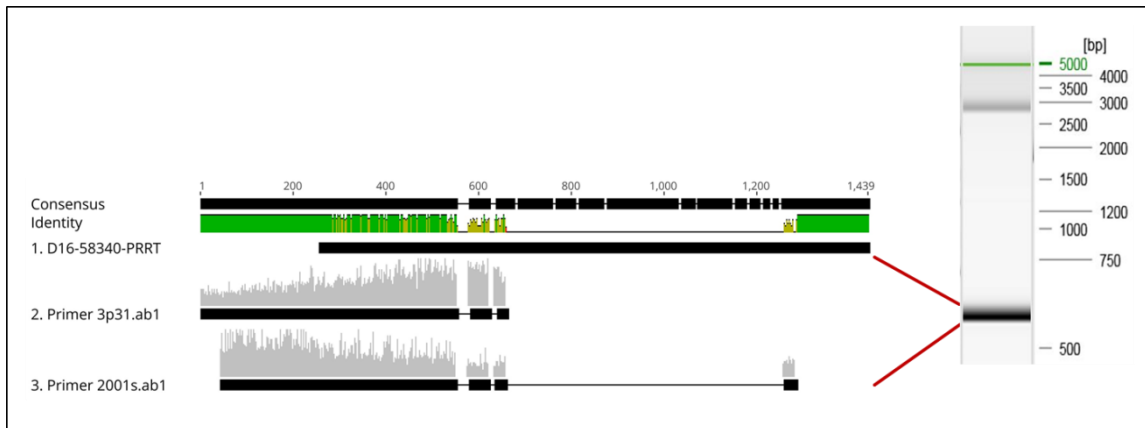


Abbildung 12: Sanger-Sequenzierung des unspezifischen pol-PCR-Produktes am Beispiel von Probe D16-58340

Zur Analyse der unspezifischen Nebenbande wurde diese mittels Sanger-Sequenzierung untersucht und mit der Software Geneious wurden die Sequenzen mit der Consensus Sequenz von PRRT aligniert und ausgewertet.

Um die RT-PCR durch weitere Modifikationen zu optimieren, wurde die RT-PCR mit und ohne Touch-Down, bzw. RNA-Präinkubation von zwei B-Subtypproben, durchgeführt (Abbildung 13). Dabei zeigte sich die größte Spezifität ohne Touch-Down mit einem RT-Schritt bei 60°C mit RNA-Präinkubation (Linien 5 und 6). Alle anderen Bedingungen resultierten in unspezifischen PCR-Produkten. Für beide getesteten Plasmaproben konnte eine spezifische Produktamplifikation erzielt werden (Abbildung 13).

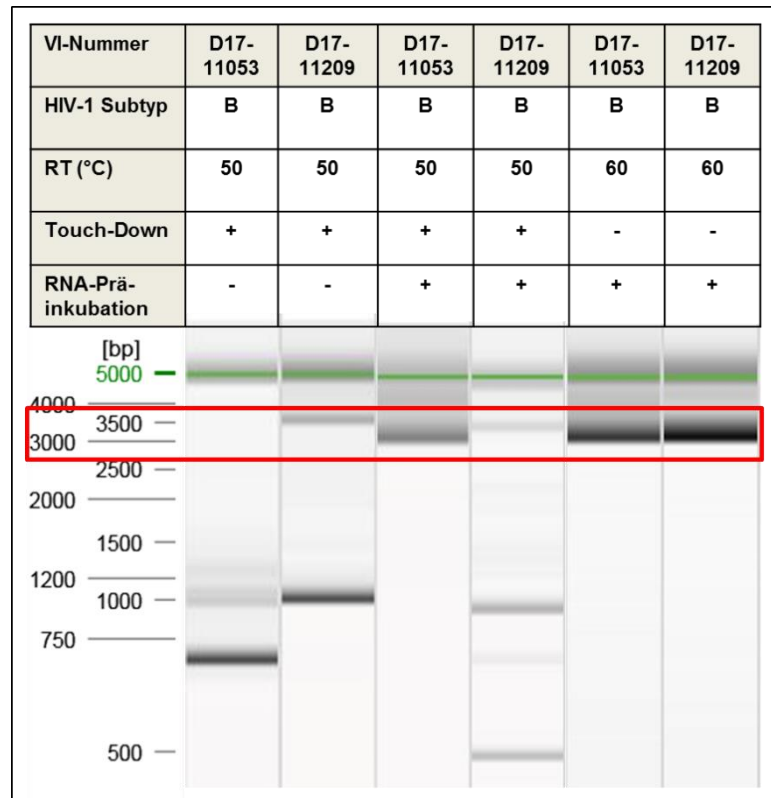


Abbildung 13: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 B-Subtypen nach RT-Schritt bei 50°C und 60°C

Die RT-PCR der HIV-1 pol-Gens von Subtyp B Proben erfolgte mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen (Tabelle 8 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese dargestellt.

Um die Relevanz des Touch-Downs in der PCR weiter zu untersuchen, wurden drei weitere Subtyp B Proben mit und ohne Touch-Down vergleichend amplifiziert. Eine konstante RT-Temperatur von 60 °C wurde sowohl für die PCR mit Touch-Down, als auch für die PCR ohne Touch-Down verwendet.

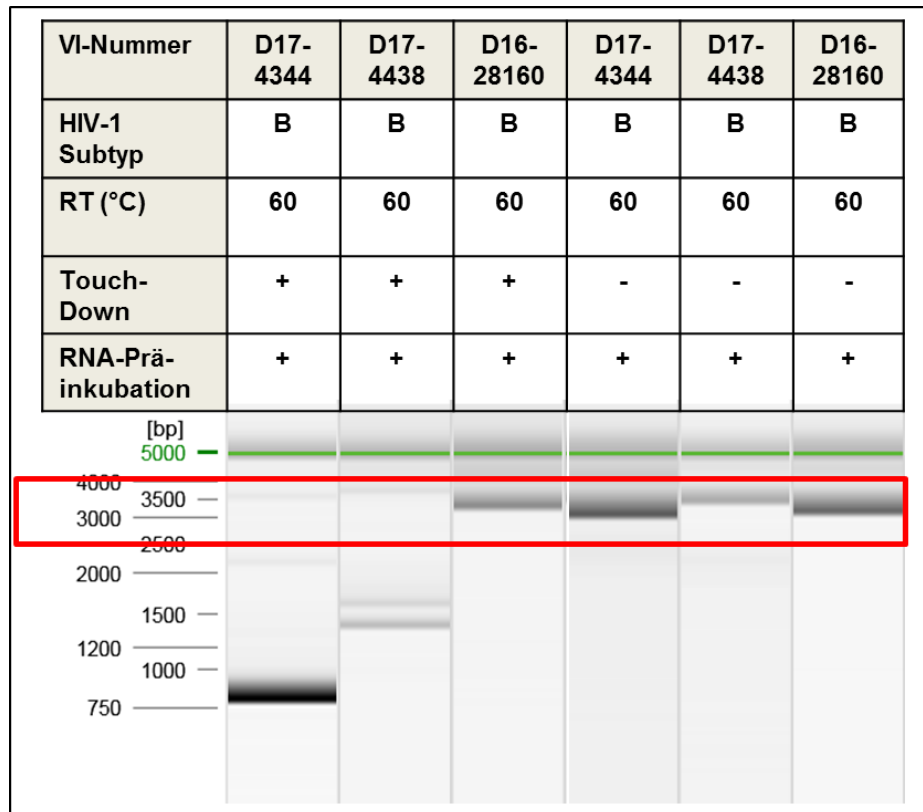


Abbildung 14: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 Subtyp B Proben nach RT-Schritt bei 60°C

Die RT-PCR des HIV-1 Subtyp B pol-Gens erfolgte mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen (Tabelle 8 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Da die RNA-Präinkubation im vorherigen Versuch einen positiven Effekt im Hinblick auf die finale Produktgröße zeigte, wurde diese weiterhin durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei den gleichen Amplifikationsbedingungen der Verzicht des Touch-Downs zu spezifischen Produkten führte (Abbildung 14).

Während den Modifikationsversuchen zur Findung der optimalen RT-PCR Bedingungen, wurde die Frage nach der optimalen RT-Temperatur untersucht. Die Ergebnisse der parallelen Untersuchungen unterschiedlicher RT-Temperaturen (50°C, 55°C, 60°C) zeigten interessanterweise, dass die Temperatur von 50°C im Vergleich zu bevorzugen ist. Zur Verifizierung der optimierten PCR-Bedingungen für den HIV-1 Subtyp B wurden insgesamt 11 weitere Subtyp B Proben mit RNA-Präinkubation, ohne Touch-Down-PCR, amplifiziert (Abbildung 15).

Die RT wurde hierbei bei 50 °C durchgeführt, um zu zeigen ob die Produkte auch bei dieser RT-Temperatur im erwarteten Größenbereich liegen. Insgesamt konnte für 8 von 11 Proben ein spezifisches PCR Produkt amplifiziert werden.

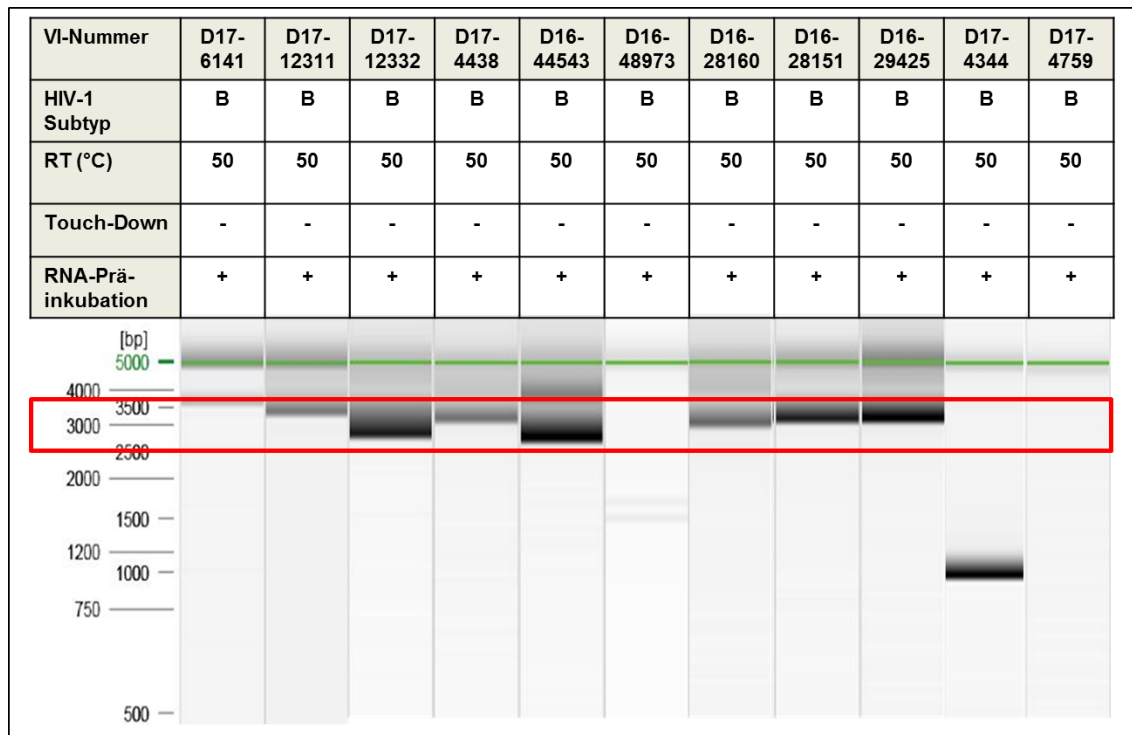


Abbildung 15: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von verschiedenen HIV-1 B-Subtypen nach RT Schritt bei 50°C.

Die RT-PCR des HIV-1 Subtyp B pol-Gens erfolgte mit diversen PCR-Parametern (Tabellen 8 - 11). Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte mittels Kapillarelektrophorese.

3.1.2 HIV-1 Non-B-Subtypen

Nachdem die Amplifikation für Subtyp B bereits optimiert werden konnte, wurde nun anhand einer Auswahl von HIV-1 non-B-Subtypen überprüft, ob die bereits optimierten PCR-Bedingungen auch bei non-B-Subtypen spezifische Amplifikate liefern. Dazu wurden zunächst 6 Plasmaproben mit verschiedenen HIV-1 non-B-Subtypen (AG, AE, C, G, AG und A1) ausgewählt (Abbildung 16). Es wurden zu Beginn der Versuche, wie bereits bei den Modifikationsversuchen der Subtyp B Proben, die gleichen Ausgangsbedingungen gewählt. Die RT wurde ohne RNA-Präinkubation durchgeführt und eine Temperatur von 50°C verwendet. Unter diesen PCR-Bedingungen konnte bereits bei den verwendeten AG- und A1-Subtypen eine erfolgreiche Amplifizierung der spezifischen Produkte erzielt werden (Linie 1, 5 und 6). Bei den anderen Subtypen resultierten die angewendeten Bedingungen in unspezifischen PCR-Produkten (Abbildung 16).

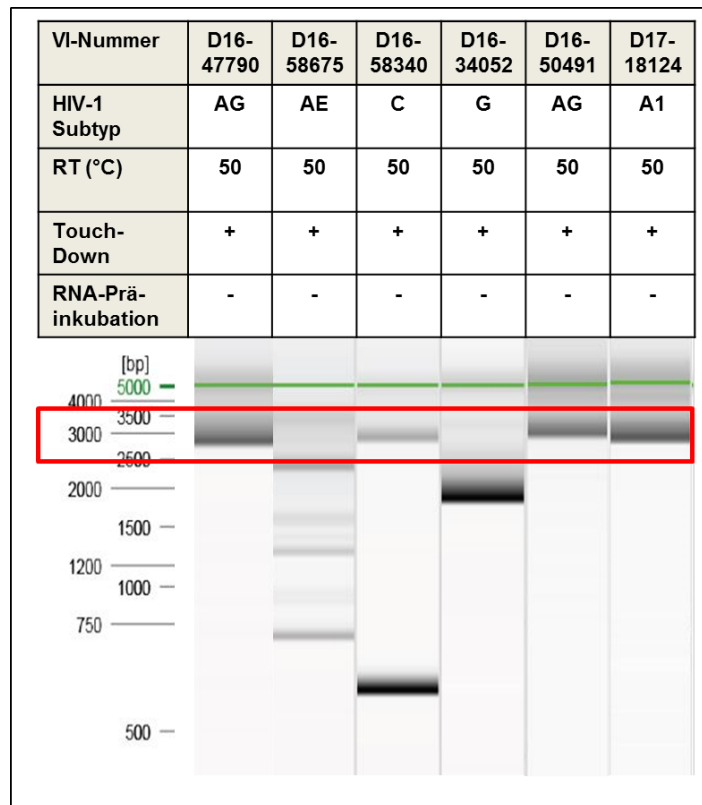


Abbildung 16: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von unterschiedlichen HIV-1 non-B-Subtypen nach RT Schritt bei 50°C

Die RT-PCR der unterschiedlichen HIV-1 non-B-Subtypen erfolgte unter den angegebenen PCR-Bedingungen (Tabelle 8 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Im nächsten Schritt wurden die gleichen Proben ohne Touch-Down, bei einer RT-Temperatur von 50°C, sowie ohne und mit RNA-Präinkubation amplifiziert, um die Auswirkung der RNA-Präinkubation und des Touch-Downs bei non-B-Subtypen zu untersuchen (Abbildung 17). Die RNA-Präinkubation erzeugte im Vergleich mehr spezifische PCR-Produkte. Auch unter diesen Amplifikationsbedingungen konnten unspezifische PCR-Produkte nicht vollständig vermieden werden (Linie 9,12).



Abbildung 17: pol-PCR mit dem Protokoll II ohne/mit RNA-Präinkubation bei non-B-Subtypen

Die PCR erfolgte im für diese Arbeit definierten Protokoll II im Vergleich ohne und mit RNA-Präinkubation.

Um die Erkenntnisse aus den Optimierungen der PCR von HIV-1 Subtyp B weiter an non-B-Subtypen zu verifizieren, wurden in einer weiteren Betrachtung die Amplifikationsbedingungen angepasst.

Dabei zeigte sich, dass bei den non-B-Subtypen eine RT-Temperatur von 50°C in Kombination mit einem Touch-Down und einer RNA-Präinkubation mehr spezifische PCR-Produkte erzeugte. Eine Erhöhung der RT-Temperatur oder ein Verzicht des Touch-Downs führte hingegen zu einem Ausfall von PCR-Produkten (Spalte 2, 3, 11, 12) oder zu unspezifischen PCR-Produkten (Linie 5, 6, 7, 8) (Abbildung 18).

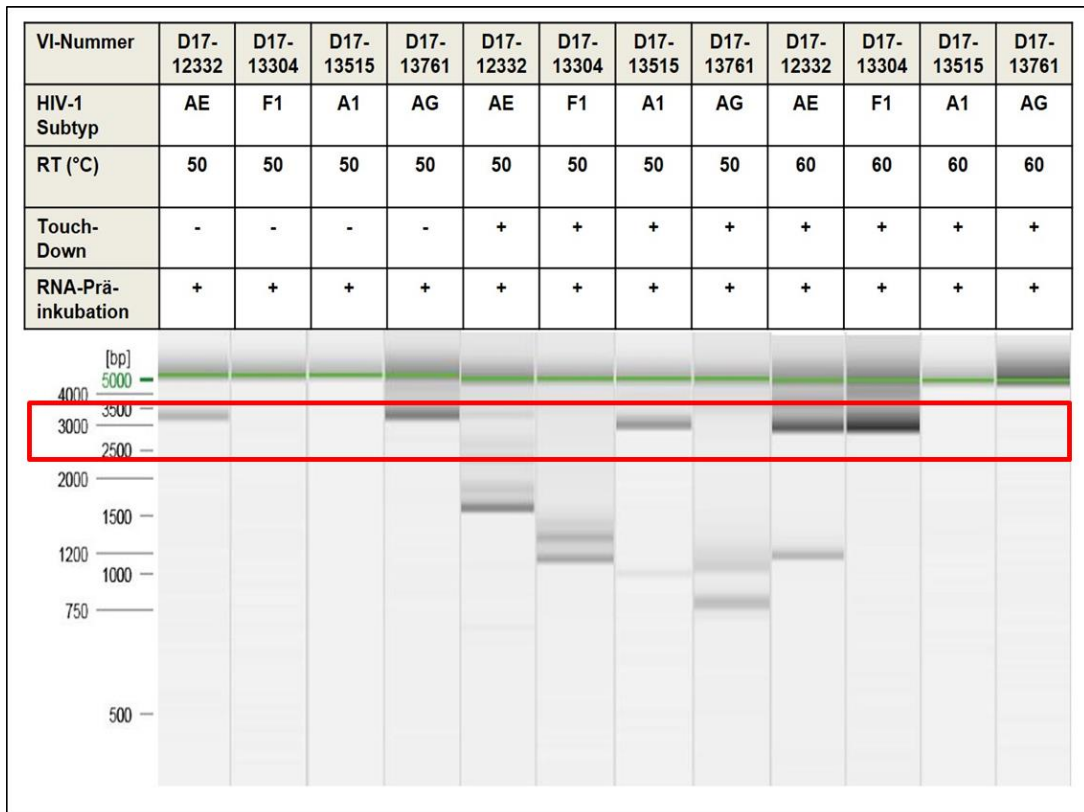


Abbildung 18: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von HIV-1 non-B-Subtypen nach RT Schritt bei angepassten Bedingungen

Die RT-PCR der unterschiedlichen HIV-1 non-B-Subtypen erfolgte unter den angegebenen PCR-Bedingungen (Tabelle 8 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Um der Frage nachzugehen, wie sich diese unspezifischen Produkte vermeiden lassen, wurde nach einem Stabilisator für die PCR gesucht.

3.2 Stabilisierung der subtypunabhängigen pol-Amplifikation durch T4gp32

Um die pol-Amplifikation subtypunabhängig zu stabilisieren, wurde in weiteren Versuchen die Wirkung von T4gp32 (T4 Gene 32 Protein) auf die pol-PCR untersucht. T4gp32 ist ein einzelsträngiges, spezifisches DNA-bindendes Protein, welches durch T4-Bakteriophagen-infizierte *Escherichia coli*-Zellen produziert wird. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass T4gp32 Protein durch die Verhinderung der Bildung von Sekundärstrukturen einen positiven Effekt auf die Effizienz und Spezifität von RT-Reaktionen während der RT-PCR hat [69-71]. Piché und Schernthaner konnten in ihren Versuchen den besten Effekt bei einer Konzentration von 3 μM T4gp32 auf RT-Reaktionen erzielen [71].

Im Vergleich wurde in dieser Arbeit der Einfluss von T4gp32 auf die PCR von sieben ausgewählten HIV-1 Plasmaproben unterschiedlicher Subtypen betrachtet (Abbildung 19). Dazu wurde die virale RNA präinkubiert, bei 50°C revers transkribiert und inklusive Touch-Down amplifiziert. Im Vergleich wurden nach dem RNA-Präinkubationsschritt die RT-PCR Ansätze mit und ohne T4gp32 angesetzt.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten bei allen Plasmaproben durch die Zugabe von T4gp32 in einer Konzentration von 3 μM pro Reaktion nach der RNA-Präinkubation einen stabilisierenden Effekt auf die Produktspezifität. Ohne T4gp32 konnte bei 4 von 7 Proben ein spezifisches Amplifikat generiert werden, wohingegen die Zugabe von T4gp32 die Spezifität auf 100 % erhöhen konnte (Abbildung 19).

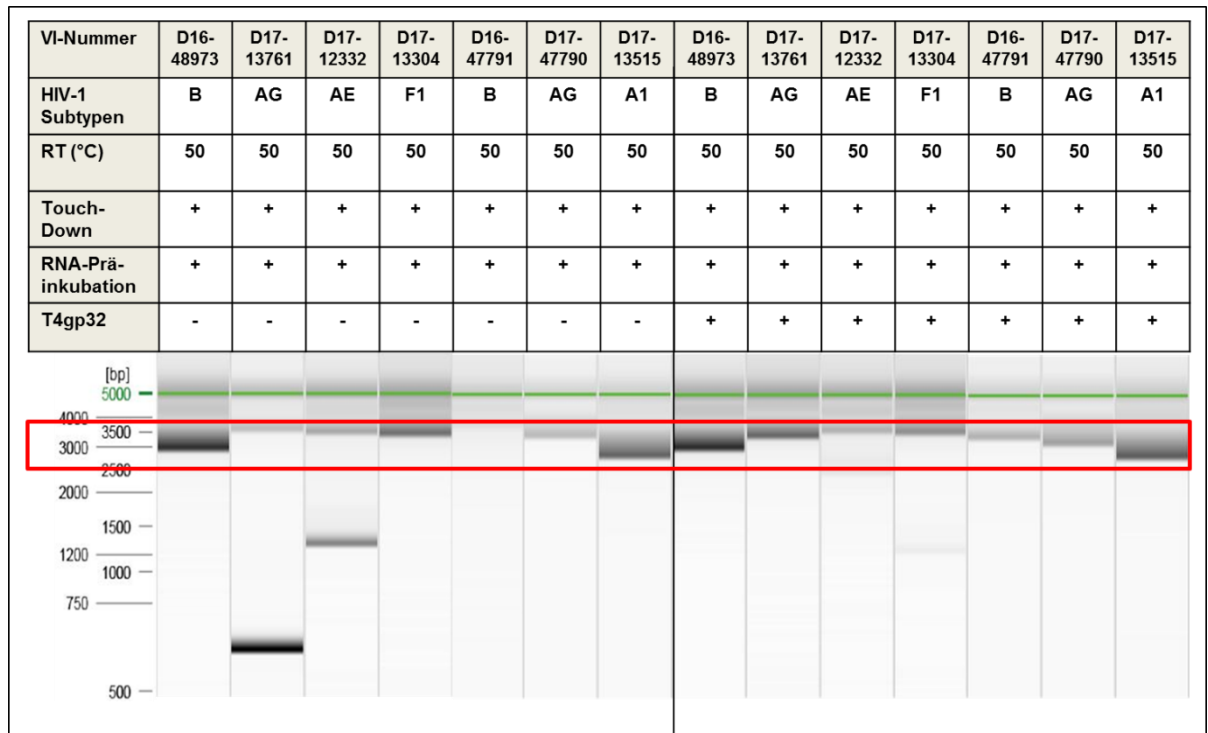


Abbildung 19: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von diversen HIV-1 Subtypen unter Verwendung von T4gp32

Die RT-PCR des HIV-1 pol-Gens unterschiedlicher Subtypen erfolgte im Vergleich ohne und mit Zugabe von T4gp32. Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Die Verwendung von T4gp32 in der PCR der unterschiedlichen B- und non-B-Subtypen erzeugte einen durchweg positiven Effekt, sodass die PCR für alle Produkte stabilisiert werden konnte und primär Produkte im Zielbereich erzeugt wurden (2982 bp - 3146 bp).

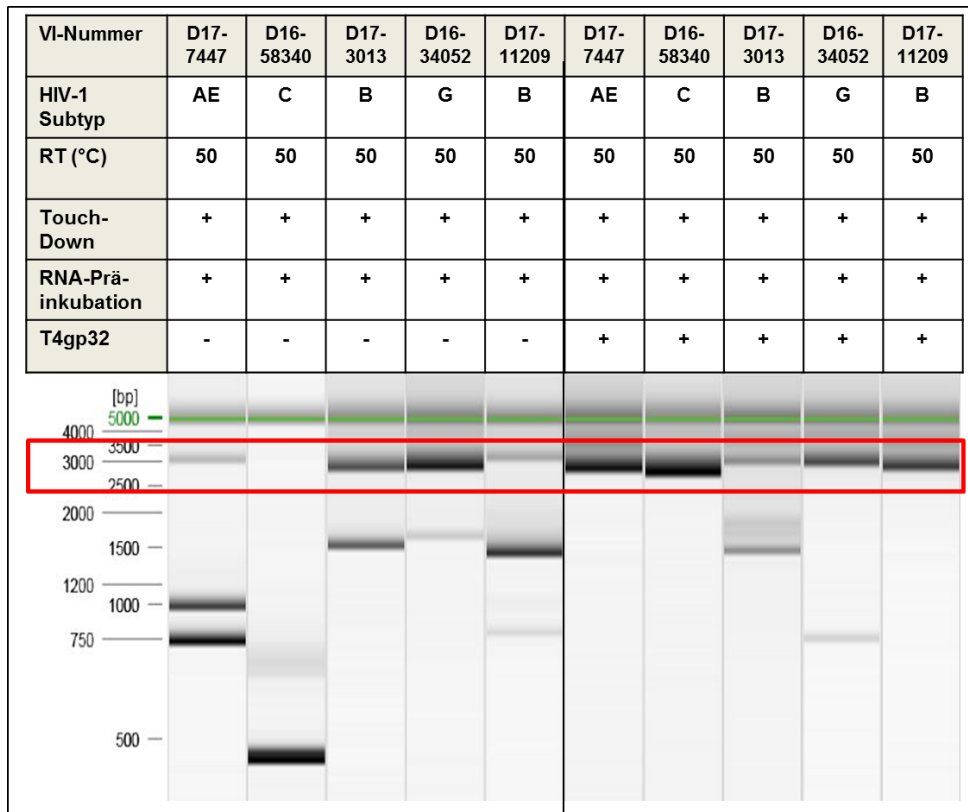


Abbildung 20: Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte von ausgewählten Proben unter Verwendung von T4gp32

Die RT-PCR des pol-Gens unterschiedlicher HIV-1 Subtypen erfolgte im Vergleich ohne und mit Zugabe von T4gp32. Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Um die Auswirkung von T4gp32 auf die pol-PCR weiter zu untersuchen, wurden in einem neuen Ansatz spezifisch Proben ausgewählt, welche in vorherigen PCR-Ansätzen deutliche Nebenprodukte lieferten. Dabei konnte bei 3 von 5 Proben eine Stabilisierung der PCR-Reaktion und somit der Produkt-Spezifität unter Verwendung von T4gp32 induziert werden. Die Optimierung des PCR-Protokolls hinsichtlich der Amplifikationsbedingungen ermöglichte bei diesen Proben bisher keine Erzeugung von spezifischen PCR-Produkten.

Erst unter Zugabe von T4gp32 zeigte sich bei allen DNA-Produkten eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Spezifität der erhaltenen Produkte.

3.3 Herstellung von rekombinanten pol-Vektoren zur klonalen Sequenzanalyse

Um der Frage nachzugehen, ob NGS Methoden die Häufigkeiten der resistenten Virusvarianten in einer Quasispezies ebenso gut wie die klonale Analyse beurteilen können, wurden rekombinante HIV-Konstrukte mit resistenten pol-Genregionen hergestellt und zur klonalen Sequenzanalyse verwendet.

Die Herstellung der rekombinanten pol-Vektoren zur klonalen Sequenzanalyse erfolgte wie bereits ausführlich beschrieben (2.2.11), anhand der Plasmaproben von 10 HIV-1 B-Subtypvarianten (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Resistenzprofile ausgewählter Plasmaproben zur Herstellung von rekombinanten HIV-Konstrukten.

Die Resistenzprofile wurden mit der klassischen Sanger-Populationssequenzierung bestimmt. DRMs = drug resistance mutations; n.B. = nicht bestimmt

Proben-ID	HIV-1 Subtyp	HIV-RNA (cop/ml)	Protease DRMs	Reverse Transkriptase DRMs	Integrase DRMs
D16-29425	B	35818		K70R, V90I, K101KN, Y115FY, Y181C, M184V, G190AG, K219E	E92EQ, N155HN
D16-39779	B	5149		A62V, K65R, V75I, F116FS, M184MV	T66IT, L74LM, P90S, T97AT, LS153AS, E157EQ, G163GR
D16-47791	B	28005		K70E, K101E, M184MV, Y188L, G190A	E92Q, E157Q
D16-53554	B	1750		T69D, Y115FY, M184V	L74LM, T97A, E138K, S147G, Q148R
5068	B	56800	V32I, L33F, M46I, I47V, F53L, I54L, L90M	M41L, D67N, V75M, K103S, M184V, G190A, L210W	G140S, Q148H
5150	B	9971	M46I, I47V, I54V, V82F, L90M	M41L, E44D, D67N, V90IV, M184V, Y188L, L210W, T215Y	L74M, T97A, Y143R
8954	B	114000	L33F, M46L, I50V, V82A, L90M	M41L, D67N, V75M, F77L, A98G, K101E, V179F, Y181C, M184V, G190S, L210W, T215Y	N155H, E157Q
12415	B	n.B.	V32IV, M46IM, I47IV, L76LV, I84IV	L74LV, K101HKNQ, K103N, V108I, Y181CY, M184MV, G190AG, L210LW, T215CY, M230LM	E138AE, G140GS, Q148HQ
14727	B	n.B.	V32I, M46I, L76V, V82A, I84V	D67N, T69D, K70R, A98G, V108I, Y181C, M184V, G190A, T215F, K219Q	E138EK, G140GS, Y143CY, Q148HQ, G149AG, G163GR
16157	B	1770	D30DN, L33FL	M184MV	T66IT, E138K, Q148R

Da zur Klonierung das gesamte pol-Fragment benötigt wurde, wurde die pol-PCR nach dem optimierten RT-PCR-Protokoll, mit vorheriger RNA-Präinkubation und einer RT-Temperatur von 50°C durchgeführt. Die Abbildung 21 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse der pol-PCR für die untersuchten Proben der Patientenkohorte. Hierbei konnte für alle zehn Proben das gewünschte PCR Produkt ohne weitere unspezifische Produkte amplifiziert werden.

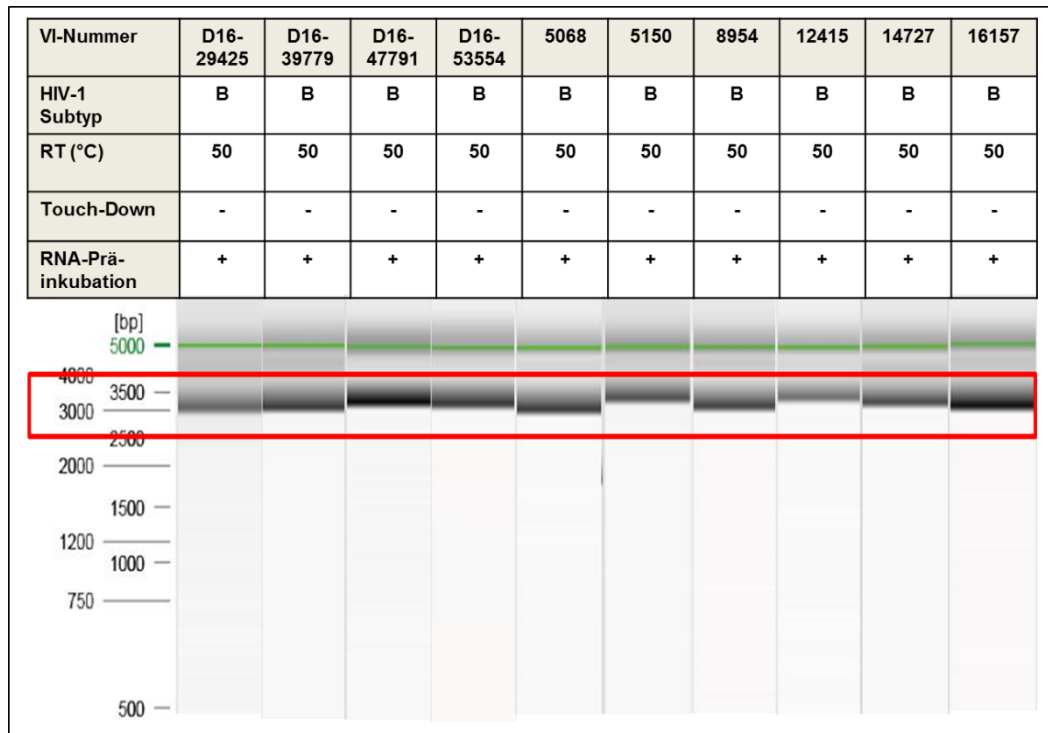


Abbildung 21: Übersichtsdarstellung der Kapillarelektrophorese der pol-PCR-Produkte aller verwendeten HIV-1 B-Subtypen zur Herstellung rekombinanter HIV-Vektoren
 Die RT-PCR des HIV-1 Subtyp B pol-Gens erfolgte mit den dargestellten PCR-Bedingungen (Tabelle 10 - 11). Die PCR-Produkte wurden über Kapillarelektrophorese visualisiert.

Die pol-PCR-Produkte sollten mittels bakterieller Klonierung vervielfältigt werden. Die Ligation der amplifizierten und aufgereinigten pol-PCR-Produkte erfolgte mit durch Q5-Polymerase geöffneten pUC18 Vektoren unter Anwendung eines Gibson Assembly. Nach erfolgter Bakterientransformation der hergestellten pol-Vektoren in kompetente NEB-5-alpha Bakterien, sowie Bakterienkultur und Mini-Plasmid-Präparation, wurde zur Kontrolle der Ligation eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Bgl I durchgeführt.

Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse werden beispielhaft für die Klone S31 bis S44 anhand der Probe 16157 gezeigt (Abbildung 22). Bei einer erfolgreichen Ligation wird der Vektor vom Enzym Bgl I so geschnitten, dass zwei Fragmente entstehen, welche eine Größe von 1118 bp und ca. 4468 bp haben. Dabei zeigte sich, dass bis auf die Klone S33 und S43 in allen Bakterien die Vektoren mit ligiertem pol-Fragment transformiert waren. Insgesamt wurden für die 10 ausgewählten Patientenproben (Tabelle 12) 637 Klone auf erfolgreiche Transformation des pol-Vektors untersucht. Insgesamt zeigten 396/637 Klone in der Restriktionsanalyse einen Klonierungserfolg (62 %).

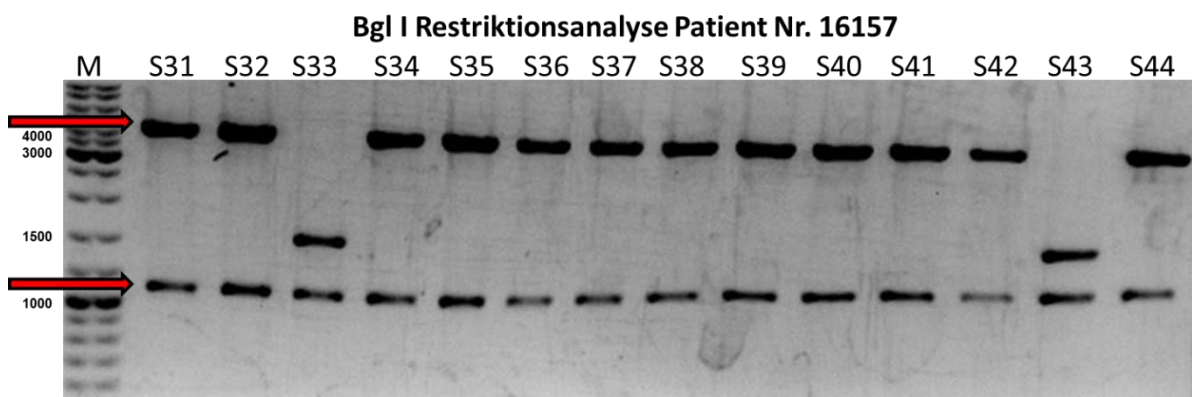


Abbildung 22: Analytische Restriktionsanalyse mittels Bgl I Restriktionsanalyse

Restriktionsanalyse der Klone S31 - S44. Die Klone S31 - S44 wurden mit dem Enzym Bgl I geschnitten. Die gewünschte Fragmentgröße (rote Pfeile) bei erfolgreicher Klonierung liegt bei 1118 bp und ~4468 bp. Die pol-PCR-Produkte entstammen der Viruspopulation der Plasma Probe 16157 (RESINA Studie).

M: Größenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 % Agarose-Gel in TBE Puffer.

Die aufgereinigten pol-Vektoren wurden nach der Sanger-Methode sequenziert, um eine vergleichende Analyse der Resistenzprofile durchzuführen. Die Sequenzen wurden mit der Software Geneious ausgewertet, um anschließend mit der Software MutExt-HIV die Resistenz-assoziierten Mutationen zu detektieren.

3.4 Vergleich der Quantifizierung von Resistenzmutationen mittels klonaler Analyse (CBS) vs. NGS

Um die Quantifizierung der resistenten Virusvarianten in einer Quasispezies zu ermöglichen, erfolgte der Vergleich der prozentualen Häufigkeiten mit den Häufigkeiten der klonalen Analyse anhand von 10 ausgewählten Proben (Tabelle 12). Hierbei wurden die Häufigkeiten der klonalen Analyse über die Klonierung der pol-Fragmente mittels Gibson Assembly mit anschließender Sanger-Sequenzierung der pol-Klone (siehe 3.3) bestimmt. Die prozentualen Häufigkeiten wurden ebenfalls durch Next-Generation Sequencing der pol-PCR-Produkte mittels der Illumina MySeq Technologie ermittelt und verglichen.

3.4.1 Quantifizierung der resistenten Varianten innerhalb einer HIV-Quasispezies

Die Resistenzprofile für alle zehn Proben konnten sowohl mittels der Sanger-Sequenzierung der pol-Klone, als auch mittels ultratiefer Sequenzierung mittels Illumina MySeq Technologie (NGS) ermittelt werden. Ein Überblick über die Resistenzprofile der verschiedenen Virusvarianten im Vergleich zwischen der Klonierung und NGS zeigt die Tabelle 13.

technische und methodische Schwankungen gewertet werden, die sich aufgrund von diversen Ursachen erklären lassen (niedrige Anzahl an Proben, Fehler der Taq-Polymerase, Primer, Amplifikationsbias, etc.).

Die Abbildung 23 zeigt die Pearson-Korrelation für die zehn untersuchten Proben. Für jede Probe wurde eine Pearson-Korrelationskoeffizienten-Gerade eingezeichnet, auf der die Punkte bei einer vollständigen Übereinstimmung der Verfahren liegen.

Die Korrelation zeigte bei 8 von 10 Proben eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Resistenzmutationen der klonalen Sequenzanalyse und NGS, $p < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$). Der lineare Zusammenhang zeigte bei diesen Proben mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,84$ eine hohe Korrelation. Die multiplen Determinationskoeffizienten r^2 zeigten dabei eine hohe Varianzaufklärung ($r^2 > 0,70$). In 7 von 10 Proben lag der Anteil der Variation der Mutationen, die sowohl in der klonalen Sequenzanalyse, als auch in NGS detektiert werden konnten, bei > 96 %.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Proben mit abweichenden Korrelationen näher erläutert.

Die Korrelation für Probe D16-39779 zeigte eine signifikante Korrelation zwischen den detektierten Resistenzmutationen in beiden Untersuchungen, $p < 0,0395$. Der lineare Zusammenhang zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,7307$ eine mittlere Korrelation. Der multiple Determinationskoeffizient $r^2 = 0,5339$ zeigte eine mittlere Varianzaufklärung, 53,4 % der Mutationen von Probe D16-39779 wurden sowohl in der klonalen Sequenzanalyse als auch in NGS detektiert.

Die Korrelation für Probe 5068 zeigte keine signifikante Korrelation zwischen den Resistenzmutationen der klonalen Sequenzanalyse und NGS, $p < 0,5660$. Der lineare Zusammenhang zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,1450$ eine negative Korrelation, Mutationen die mit der klonalen Sequenzanalyse häufiger detektiert werden, werden in NGS seltener detektiert und umgekehrt. Der multiple Determinationskoeffizient $r^2 = 0,02102$ zeigt eine unzureichende Varianzaufklärung, nur 2,1 % der Mutationen von Probe 5068 werden in der klonalen Sequenzanalyse und in NGS gleich häufig detektiert.

Im Folgenden werden die prozentualen Abweichungen der Mutationen zwischen der klonalen Sequenzanalyse und NGS näher erläutert. Dabei wurde eine Abweichung von 0 - 5 % als eine hohe Übereinstimmung eingestuft, eine Abweichung von 5 - 15 % als geringe Abweichung und eine Abweichung von > 15 % als eine hohe Abweichung (Tabelle 13).

Mutationen mit hoher Übereinstimmung (Abweichung 0-5%)

Eine hohe prozentuale Übereinstimmung der Resistenzmutationen zwischen den Verfahren zeigte sich in der PR bei den Mutanten 30N, 32I, 33F, 46I, 46L, 47V, 50V, 53L, 54L, 54T, 54V, 73C, 73S, 76V, 82A, 84V, 88D, 88S und 90M. Insgesamt zeigten in der PR 80,43 % der DRMs eine hohe Übereinstimmung zwischen NGS und CBS.

In der RT wurde eine hohe prozentuale Übereinstimmung zwischen den Verfahren bei den Resistenzmutationen 41L, 62V, 65R, 67G, 67N, 69D, 70E, 70R, 74V, 75A, 75I, 75M, 98G, 101E, 103S, 103N, 108I, 115F, 148V, 179F, 181C, 184I, 184V, 188H, 188L, 190A, 190E, 190S, 210W, 215A, 215C, 215F, 215Y, 219E, 219R, 219Q, 227L, 238N und 238T nachgewiesen. Die DRMs der RT zeigten in 91,86 % der Fälle eine hohe Übereinstimmung zwischen NGS und CBS.

In der IN wurde eine hohe prozentuale Übereinstimmung zwischen den Verfahren bei den Resistenzmutationen 92Q, 97A, 121Y, 138K, 140S, 143R, 147G, 148H, 148R, 155H, 157Q und 163R nachgewiesen. Die DRMs der IN zeigten in 83,33 % der Fälle eine hohe Übereinstimmung zwischen NGS und CBS.

Mutationen mit geringen Detektionsabweichungen (5-15 % Abweichung)

Eine geringe prozentuale Abweichung der Resistenzmutationen zwischen den Verfahren zeigt sich in der PR in 17,4 % der Fälle. Die Mutanten 32I (Probe D16-29425), 46I (Probe 16157), 54L und 76V (Probe 12415), 82F und 82S (Probe 5150), 88S (Probe D16-29425) und 90M (Probe 12415) wiesen eine geringe prozentuale Abweichung auf.

In der RT wurde eine geringe prozentuale Abweichung bei 4,7 % der Fälle zwischen den Verfahren nachgewiesen, dazu zählten die Resistenzmutationen 62V (Probe D16-47791), 77L (Probe D16-39779, 8954) und 184V (Probe D16-29425).

In der IN wurde eine geringe prozentuale Abweichung bei 13,3 % der Fälle zwischen den Verfahren nachgewiesen, dazu zählten die Resistenzmutationen 74M (Probe 5150), 138A (Probe 12415) und 157Q (Probe D16-39779).

Mutationen mit hohen Detektionsabweichungen (>15% Abweichung)

Eine hohe prozentuale Abweichung der Resistenzmutationen zwischen den Verfahren zeigt sich in der PR mit der Mutante 65R (Probe D16-39779) in 2,2 % der Fälle.

In der RT zeigten 3,5 % der Fälle eine hohe prozentuale Abweichung zwischen den Verfahren, dazu zählten die Mutanten 65R (Probe D16-39779), sowie 70R und 190A (Probe D16-29425). Die Mutante 33F in der RT (Probe 14727) zeigte ebenfalls eine hohe prozentuale Abweichung, dabei wurde die Mutante ausschließlich mittels Klonierung nachgewiesen(100 %).

In der IN wurde eine hohe prozentuale Abweichung in 3,3 % der Fälle zwischen den Verfahren nachgewiesen, dies war bei der Resistenzmutation 74M (Probe D16-53554) der Fall.

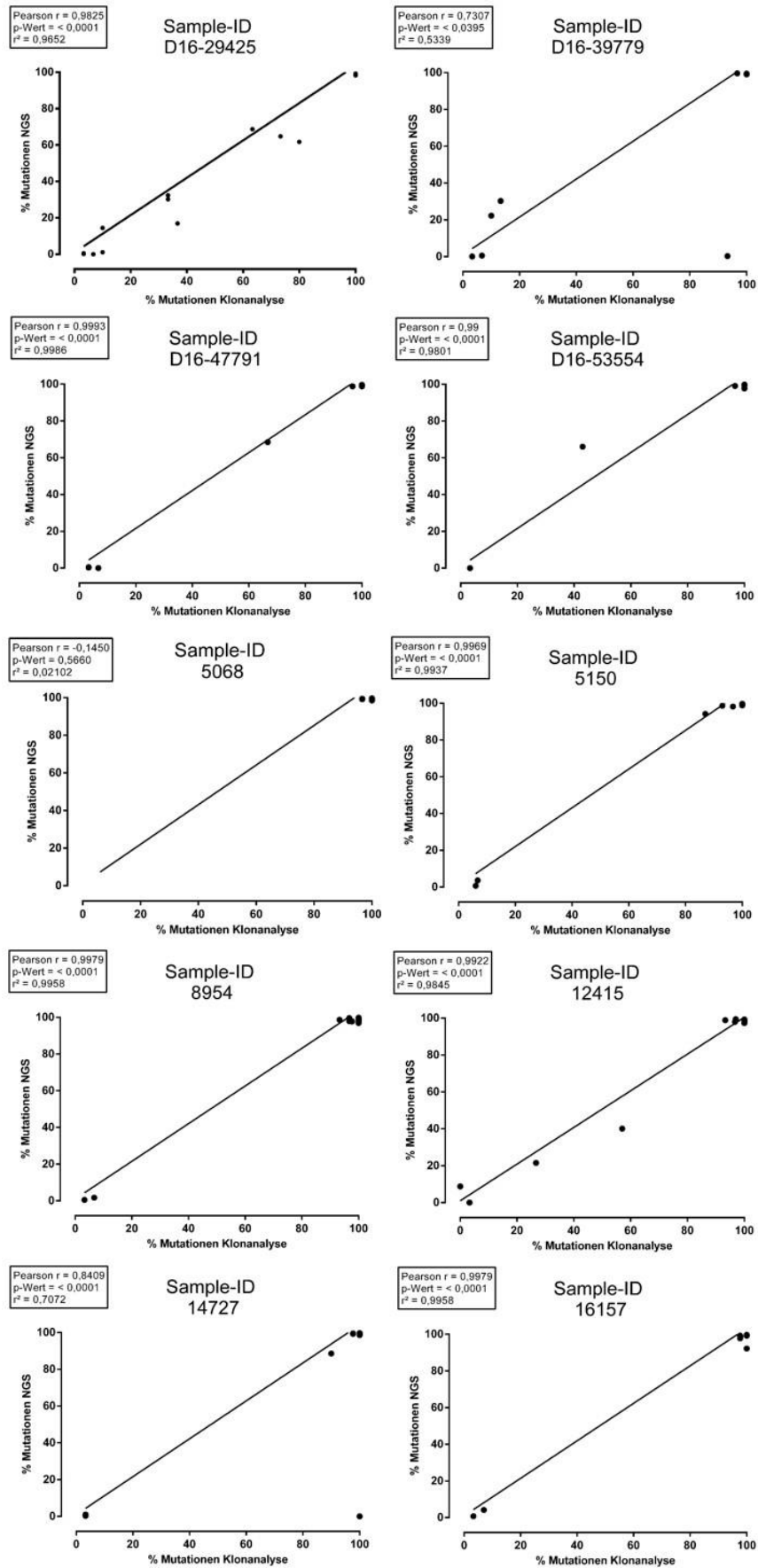


Abbildung 23: Pearson Korrelation der Resistenzmutationen aller Proben detektiert über NGS und klonale Analyse

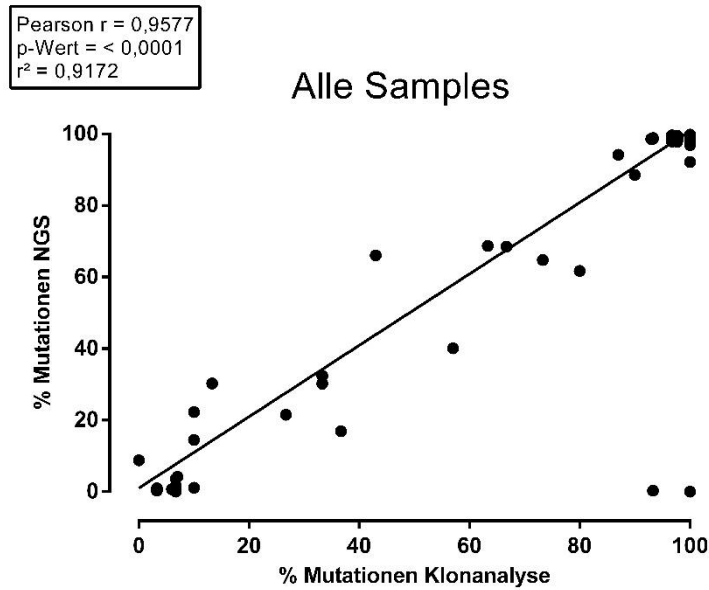


Abbildung 24: Pearson Korrelation der Resistenzmutationen aller Klone

Die Korrelation für die Gesamtzahl der analysierten Proben zeigte eine hochsignifikante Korrelation zwischen den detektierten Resistenzmutationen der klonalen Sequenzanalyse und NGS, $p < 0,0001$ (Abbildung 24). Der lineare Zusammenhang zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9577$ eine hohe Korrelation. Der multiple Determinationskoeffizient $r^2 = 0,9172$ zeigte eine hohe Varianzaufklärung, 91,7 % der Mutationen aller Proben werden sowohl in der klonalen Sequenzanalyse als auch mit NGS gleich häufig detektiert.

Wie sich bereits in der Pearson-Korrelation zeigte, lagen sehr hohe Übereinstimmungen zwischen der klonalen Sequenzanalyse und dem NGS vor. Von insgesamt 75 Resistenzmutationen konnte in 163 Fällen eine Resistenz detektiert werden. Davon wurde in 162 Fällen eine Resistenz mittels klonaler Sequenzanalyse (99,4 %) und in 153 Fällen mittels NGS (93,9 %) detektiert.

Die untersuchten Methoden zeigten in 87 % eine hohe Übereinstimmung.

Insgesamt konnten auffällige Unterschiede in den Detektionshäufigkeiten ($> 15\%$) nur in 3 % der Fälle nachgewiesen werden. Dabei gab es sowohl Mutationen, die vermehrt mittels klonaler Sequenzanalyse (33F, 65R, 70R, 190A) und solche, die vermehrt mittels NGS nachgewiesen werden konnten (74M) (Tabelle 14).

Tabelle 14: Übersichtstabelle der diskrepanten Mutationshäufigkeiten zwischen Clone-based Sequencing (CBS) und Next-Generation Sequencing (NGS)

	Sensitivität CBS>NGS			Sensitivität NGS>CBS		
	Mutationen	Klonierung	NGS	Mutationen	Klonierung	NGS
PR	32I	6,7%	0%	76V	93,3%	98,9%
	33F	100%	0%	82F	93,0%	98,6%
	46I	100%	92,2%	90M	0%	8,8%
	54L	26,7%	21,5%			
	82S	6,0%	0,7%			
	88S	10,0%	1,1%			
RT	62V	6,7%	0%	77L	93,3%	98,7%
	65R	93,3%	0,3%	184V	63,3%	68,7%
	70R	36,7%	16,9%			
	77L	6,7%	0,6%			
	190A	80,0%	61,7%			
IN	92Q	73,3%	64,8%	74M	43,0%	66,1%
	138A	57,0%	40,1%		87,0%	94,2%
				157Q	10,0%	22,3%

In der durchgeführten Analyse wurden vereinzelt Mutationen ausschließlich mittels Sanger detektiert. Dieses Phänomen ist vermutlich durch Virusvarianten bedingt, die während der Replikation entstehen oder auf technische Artefakte zurückzuführen sind. Dies wurde auch bereits in anderen Untersuchungen beobachtet [72]. Die Mutationen 238N und 238T in der IN konnten ausschließlich in der klonalen Sequenzanalyse nachgewiesen werden (je 3,3%), (Probe D16-53554).

Alle weiteren Mutationen, die bei einzelnen Proben ausschließlich in der klonalen Sequenzanalyse und nicht mittels NGS detektiert wurden, waren die Mutationen 32I (6,7 %), 33F (100 %), 47V (3,3 %), 53L (3,3 %), 88S (3,3 %) in der PR und 62V (6,7 %), 65R (3,3 %), 67G (3,3 %) in der RT.

Diese Mutationen wurden bei den anderen Vergleichsproben jedoch auch erfolgreich mittels NGS detektiert. In der IN konnten keine Mutationen detektiert werden, die ausschließlich mit einem der beiden Verfahren detektiert wurden.

Mittels NGS konnte die Mutation 90M in der PR bei einer Probe (12415) nachgewiesen werden (8,8 %), dieselbe Mutation konnte in der gleichen Probe mittels klonaler Sequenzanalyse nicht nachgewiesen werden. Ein Nachweis der gleichen Mutation in weiteren Proben war jedoch mit beiden Methoden möglich.

In den Versuchen wurde bis auf die Mutation 90M in der PR (8,8 %) keine weitere Mutation ermittelt, die ausschließlich mittels NGS detektiert wurde.

Die Mutation 115F in der RT (D16-29425) wurde mittels NGS häufiger nachgewiesen (4,5 %). Die Mutation 74M in der IN wurde in zwei Proben (D16-53554, 5150) mittels NGS prozentual häufiger nachgewiesen, als mittels klonaler Sequenzanalyse (94,2 % versus 87 % bei 5150, 66,1 % versus 43 % bei D16-53554).

3.4.2 Analyse der Koexistenz von Resistenzmutationen in verschiedenen Genregionen einzelner Virusvarianten

Mit dem in dieser Arbeit etabliertem PCR-Protokoll ist es erstmals möglich, das pol-Gen als Ganzes zu amplifizieren. Der Vorteil eines großen pol PCR-Produktes besteht darin, dass die Verteilung der Mutationen auf den einzelnen Genabschnitten für die jeweilige Virusvariante untersucht werden könnten.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die mittels NGS oder CBS ermittelten prozentualen Häufigkeiten der detektierten Mutationen, die prozentuale Häufigkeit der Mutationen in der Quasispezies widerspiegelt. Dies liefert die Möglichkeit, sowohl die Mutationen für jede einzelne Virusvariante, als auch die Häufigkeit der verschiedenen resistenten Virusvarianten innerhalb der Quasispezies zur ermitteln.

Für die Probe D16-29425 konnten in der RT Region die Mutationen 181C und 219E zu jeweils 98 % bzw. 99 % der amplifizierten PCR-Produkte mittels NGS nachgewiesen werden, wohingegen die 184I nur zu 30 % detektiert wurde. Auf der zugehörigen Integrase Region wiesen auch nur 32 % der Virusvarianten die Mutation 155H auf. Daraus lässt sich ableiten, dass die Virusvarianten mit 181C und 219E nur in circa 30 % auch die Mutation 184I in der RT und die 155H in der Integrase selektiert haben.

Auch die Virusvarianten der Proben D16-53554 und D16-39779 zeigten die Selektion von unterschiedlichen Resistenzprofilen. Während in der Probe D16-53554 in der RT Region die Mutationen 69D und 184V zu jeweils 99 % mittels NGS nachgewiesen werden konnten, trugen diese Varianten die IN Mutation 74M nur zu 66 %. Die Probe D16-39779 zeigte sogar innerhalb der IN Genregion

unterschiedliche Selektionsprofile. Sowohl die Mutationen 62V, 65R, 75I in der RT, als auch die Mutation 97A in der IN wurden in über 99 % der Varianten nachgewiesen, wohingegen die IN Mutation 157Q nur in 22 % der Varianten nachweisbar war.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten ermöglichen es somit, aufgrund der Amplifikation und der ultratiefen Sequenzierung der vollständigen pol PCR-Genregion, die Koexistenz von Resistenzmutationen in verschiedenen Genregionen einzelner Virusvarianten innerhalb der Quasispezies zu analysieren.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz zur Optimierung der Amplifikationsmethode des kompletten HIV-1 pol-Gens untersucht. Insbesondere das Vorkommen von Arzneimittelresistenzen, durch Mutationen von HIV-1 beim Menschen, macht es erforderlich die Amplifikationsmethoden für HIV-1 zu verbessern. Dies ist notwendig, um sowohl die antiretrovirale Therapie optimieren zu können, als auch die Untersuchung der Koevolutionen von HIV-1 Mutationen zu erleichtern [73].

Dabei wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, Mutationen der Integrase Genregion in einem PCR-Ansatz mitzubestimmen, da die aktuellen Therapieempfehlungen der HIV Therapie auch Integrase-Inhibitoren (INIs) als Bestandteil der First-Line Therapie beinhalten. Die INIs stellen starke Kombinationspartner mit einer breiten Wirkung gegen multiresistente HIV-1 Stämme dar, aufgrund dieser Eigenschaften wird eine steigende Anzahl an Patienten mit INIs behandelt [74, 75].

Der erste Teil der Arbeit beinhaltete die Optimierung und Anwendung eines neuen PCR-basierten Protokolls, um für die breite Spanne der unterschiedlichen HIV-1 Subtypen das HIV-1 pol-Gen als Ganzes zu amplifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde verglichen, inwiefern sich die HIV-Quasispezies anhand der via NGS ermittelten prozentualen Häufigkeit von Resistenzmutationen, im Vergleich zum Goldstandard der klonalen Resistenzanalyse, widerspiegeln. Dazu wurden die Resistenzprofile von zehn ausgewählten HIV-1 B-Subtypen sowohl durch Klonierung der pol-Fragmente mit anschließender Sanger-Sequenzierung, als auch durch NGS mittels der Illumina MySeq Technologie analysiert.

4.1 Optimierung der Amplifikationsmethode des HIV-1 pol-Gens

Die Analyse von Resistenz-assoziierten Mutationen erfolgt routinemäßig über die Sequenzierung der für die Therapie relevanten Regionen des HIV Genoms. Diese sind insbesondere verschiedene Regionen des HIV pol-Gens, welche für die HIV Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN) codieren. Im Falle der HIV-1 pol-Region werden derzeit in der klinischen Praxis

die benachbarten Sequenzen für Protease und Reverse Transkriptase gemeinsam amplifiziert und anschließend sequenziert, während die 3' gelegene Integrase Region gesondert davon analysiert wird [74, 76-79].

In früheren Arbeiten am Institut für Virologie in Düsseldorf, konnte bereits eine Amplifikation des gesamten HIV-1 pol-Fragments bei HIV-1 Zellkulturüberständen etabliert werden (Ebner et al.).

Die PCR-Amplifikation der HIV pol-Genregion ist mit mehreren Herausforderungen verbunden, zum einen bedingt durch die Diversität der Genomsequenzen unterschiedlicher viraler Quasispezies bei infizierten Patienten und zum anderen aufgrund der zahlreichen HIV-1 Subtypen. Aus diesem Grund sind PCR-Protokolle, die die HIV-1 pol-Genregion subtypunabhängig amplifizieren von zentraler Bedeutung [80, 81]. Eine weitere Herausforderung für die Amplifikation stellt Probenmaterial mit einer geringen Menge an viralem Genom dar, dies ist bei Patienten mit einer Low-Level-Virämie (LLV) der Fall [82].

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Optimierung des Amplifikationsverfahrens die pol-PCR ausreichend stabilisiert werden, um auch eine vollständige Amplifikation des HIV-1 pol-Fragments bei Patientenproben mit niedrigen Viruslasten zu ermöglichen. In bisherigen Arbeiten wurden bereits Protokolle zur Amplifikation von HIV-1 bei niedrigen Viruslasten beschrieben, allerdings zeichneten sich diese Protokolle durch geringe Produktmenge, unzureichende Reproduzierbarkeit aufgrund fehlender technischer Details, schlechte subtypenunabhängige Anwendbarkeit oder begrenzte Sensitivität aus [83-86].

Vielversprechende Ansätze zur Amplifikation bei LLV Patientenproben beschränkte sich auf die PRRT Genregion, sodass die IN Region des pol-Gens nicht mit amplifiziert wurde [87].

Um die Entwicklung eines subtypunabhängigen Protokolls zu ermöglichen, wurden wesentliche Parameter der PCR variiert. Dazu zählen die optimale RT-Temperatur, ein Touch-Down in der PCR und eine RNA-Präinkubation.

Begrenzt auf diese Modifikationsparameter konnte bei den B-Subtypen gezeigt werden, dass die RNA-Präinkubation in Kombination mit dem Verzicht auf einen Touch-Down, einen wesentlichen Anteil daran hat, die pol-PCR zu stabilisieren und spezifische Produkte zu generieren. Die RT-Temperatur hat dabei einen sekundären Stellenwert. Die Ergebnisse bei parallelen Ansätzen deuten darauf hin, dass eine RT bei 50°C gegenüber einer RT bei 60°C zu bevorzugen ist. Dies wird

auch durch Daten aus früheren Arbeiten bestätigt, in denen eine niedrigere RT-Temperatur ein besseres „Outcome“ begünstigte [88].

Da das zu amplifizierende pol-Fragment mit einer Länge von ca. 3kb sehr groß ist, wurde vermutet, dass ein Großteil der unspezifischen PCR Produkte durch eine fehlerhafte Amplifikation bedingt ist. Im Rahmen von Analysen der unspezifischen PCR-Produkte wurden diese mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass es sich nicht um eine unspezifische Primerbindung handelte, sondern um eine Deletion im PCR-Produkt, welche durch RNA-Sekundärstrukturen bzw. sterische Hindernisse der Polymerase während des Amplifikationsprozesses zu erklären ist.

Auch unter Anwendung des optimierten PCR-Protokolls mit einer RT von 50°C, ohne Touch Down und mit RNA-Präinkubation bei den B-Subtypen konnte nicht verhindert werden, dass unspezifische PCR-Produkte amplifiziert wurden. Dies deutete darauf hin, dass auch das modifizierte Protokoll nicht ausreichend war, um eine Stabilität der PCR zu gewährleisten.

Bei der Anwendung des modifizierten Protokolls konnte nur bei 8 von 11 Subtyp B Proben ein spezifisches PCR Produkt amplifiziert werden. Bei zwei Proben konnte hingegen kein Produkt und bei einer Probe nur ein unspezifisches Produkt amplifiziert werden. Dies könnte daran liegen, dass die Primer-Bindung aufgrund von RNA-Sekundärstrukturen (z.B. Loops) oder sterischen Hindernissen unterbunden wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Viruslast der Proben zu niedrig war, um unter den angewendeten Bedingungen ein PCR-Produkt von 3kb zu amplifizieren.

Nachdem bereits bei HIV-1 B-Subtypen, bedingt durch die Modifikation der unterschiedlichen PCR-Parameter, eine deutliche Verbesserung der Spezifität erzielt werden konnte, wurde die Anwendbarkeit für Non-B-Subtypen geprüft. Bei den Versuchen stellte sich heraus, dass die Non-B-Subtypen bezogen auf die PCR-Bedingungen sehr heterogen reagierten. Diese Eigenschaft der Non-B-Subtypen wurde in früheren Arbeiten bereits gezeigt [41, 89]. Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass die Amplifikation von Non-B-Subtypen mittels der etablierten Methoden im Gegensatz zu B-Subtypen schlechtere Ergebnisse liefern. In diesen Arbeiten wurde unter anderem der Ansatz verfolgt zahlreiche Primer zu verwenden, um die subtypspezifischen Gensequenzen amplifizieren zu können [86, 90, 91].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Primer eine gute Bindung erzielten. Das Problem stellten insbesondere die unspezifischen Produkte dar, dabei konnte die Ursache hierfür nicht auf die Primerbindung zurückgeführt werden. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass das PCR-Protokoll für die pol-Amplifikation von HIV-1 Non-B-Subtypen bei einer RT von 50°C und einer RNA-Präinkubation die besten Ergebnisse erzeugte. Im Gegensatz zu den B-Subtypen zeigte die Anwendung eines Touch-Downs eine deutliche Verbesserung der Produktspezifität. Da die pol-Amplifikation jedoch ohne Touch-Down die beste Spezifität zeigte, zielte die weitere Untersuchung darauf ab, ein stabiles und einheitliches Protokoll für B und Non-B-Subtypen zu entwickeln.

Da bei den Non-B-Subtypen unter den modifizierten Bedingungen für alle Proben keine ausreichende Spezifität erzielt werden konnte, wurde ein möglicher Stabilisator für die Amplifikation eingesetzt. In einer früheren Arbeit wurde für die PCR des Murinen Leukämievirus (MMLV) durch Zugabe von T4gp32 in die Reverse-Transkriptionsreaktion eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität erreicht [71]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Anwendung von T4gp32 als Stabilisator der pol-PCR von HIV-1 untersucht. Dabei konnte in dieser Arbeit erstmals der positive Effekt von T4gp32 sowohl auf die Amplifikation von HIV-1 B-Subtypen, als auch auf die Amplifikation von HIV-1 Non-B-Subtypen nachgewiesen werden. In Kombination mit dem in dieser Arbeit optimierten pol-PCR-Protokoll ermöglichte die Anwendung von T4gp32 die Stabilisierung der RNA während der pol-PCR und dadurch eine erhöhte Produktspezifität, wodurch ein einheitliches PCR-Protokoll für B- und Non-B-Subtypen etabliert werden konnte. Die spezifischen Produkte konnten sowohl subtypunabhängig, als auch bei niedrigen Viruslasten erzeugt werden.

4.2 Möglichkeiten der Resistenzanalyse

Die genotypische Resistenzanalyse zur Erkennung von DRMs stellt einen wesentlichen Aspekt dar, um die Wirksamkeit der antiretroviralen Therapie dauerhaft zu gewährleisten. Die Quantifizierung von resistenten Virusvarianten ist in den vergangenen Jahren zu einem der wichtigsten Faktoren der Patientenversorgung geworden [92], um u.a. die antiretroviralen Medikamente auszuwählen.

Die Kontrolle der Virusvarianten auf das Vorliegen von Resistenzmutationen zur Anpassung der antiretroviralen Therapie verbessert nachweislich die Lebensqualität von Patienten [93]. Seit 2013 hat sich NGS in der Routinediagnostik bewährt. Das Verfahren ermöglicht es, die prozentuale Verteilung von Mutationen der verschiedenen Virusvarianten zu untersuchen. In dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit des NGS Verfahrens zum Nachweis von genotypischen Resistenzanalysen dahingehend untersucht werden, ob die detektierten Mutationen die Verteilung innerhalb der Quasispezies abbilden. Dazu wurde die Verteilung von DRMs durch NGS bestimmt und mit der Verteilung verglichen, welche durch klonale Sequenzanalyse (CBS) ermittelt wurde.

4.2.1 Resistenzanalyse durch CBS

Für die Quantifizierung von resistenten Virusvarianten wurde in der Vergangenheit in großem Umfang die Klonierung von PCR-Produkten mit anschließender Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Das Verfahren wurde insbesondere zur Bestimmung der Vielfalt der viralen Quasispezies genutzt [94].

Auf der einen Seite ist diese Methode hochgradig reproduzierbar und interpretierbar, sowie in Forschung und Klinik etabliert [95], auf der anderen Seite ist sie jedoch zeitaufwendig, arbeitsintensiv und kostspielig.

4.2.2 Resistenzanalyse durch NGS

Die Next-Generation Sequencing Technologien haben sich in den letzten Jahren rasant weiterentwickelt, welches auch unmittelbare Auswirkungen auf die Durchführung von etablierten Laboranalyseprotokollen hatte [96]. NGS ist wie die Sanger-Sequenzierung stabil, liefert aber zusätzliche Daten über niederfrequente HIV-resistente Virusvarianten [97, 98]. Die verstärkte Anwendung von NGS zur Detektion von DRMs bei HIV-1 in Forschung und Klinik lässt sich auch auf geringere Kosten zurückführen [93]. NGS hat als Sequenzierungsmethode der „zweiten Generation“ die Sanger-Sequenzierung als primäre Methodik in der Forschung zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen bereits in zahlrei-

chen Fällen abgelöst [92, 99-101]. NGS zeigte in bisherigen Arbeiten vielversprechende Ergebnisse für Resistenzanalysen und die Identifizierung von minoren (niederfrequenten) Varianten [102, 103].

4.2.3 Analyse und Vergleich CBS und NGS

In der vorliegenden Arbeit sollte die Quantifizierung von resistenten Virusvarianten innerhalb einer Quasispezies durch Analyse mittels CBS und NGS verglichen werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten überzeugend, dass die beiden Verfahren ein hohes Maß an Übereinstimmung liefern, um die Resistenzprofile der zehn untersuchten Proben nachzuweisen. Die untersuchten Methoden zeigten in 87 % (PR 80,4 %, RT 91,9 %, IN 83,3 %) eine hohe Übereinstimmung, wobei Abweichungen unter einem Wert von 5 % als technische und methodische Schwankungen gewertet wurden. Diese lassen sich durch unterschiedliche Faktoren erklären, u. a. durch eine niedrige Anzahl an Proben oder Amplifikationsfehler der Taq-Polymerase. Insgesamt konnten auffällige Unterschiede in den Detektionshäufigkeiten (> 15 %) nur in 3 % der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Dabei gab es sowohl Mutationen, die vermehrt mittels klonaler Sequenzanalyse (33F, 65R, 70R, 190A) und solche, die vermehrt mittel NGS nachgewiesen werden konnten (74M). Die festgestellten Unterschiede in den Detektionshäufigkeiten der verschiedenen Verfahren konnten nicht auf eine Selektion unterschiedlicher Virusvarianten zurückgeführt werden und basieren daher vermutlich auf Selektionsunterschieden der Methoden. Um die Ursache zu klären müssten jedoch weitere Viruspopulationen mit diesen Mutationsprofilen untersucht werden.

Für die Gesamtzahl der analysierten Proben bestand eine hochsignifikante Korrelation zwischen den detektierten Resistenzmutationen. Dabei wurden 91,7 % der Mutationen aller Proben sowohl in der klonalen Sequenzanalyse, als auch mittels NGS detektiert.

Bei insgesamt 9 von 10 Proben konnte eine signifikante Korrelation zwischen den detektierten Resistenzmutationen in beiden Untersuchungen festgestellt werden ($p < 0,05$), dabei zeigten 8 von 10 Proben eine hochsignifikante Korrelation der zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden ($p < 0,001$).

Nur in einer Probe mit einer sehr geringen Anzahl an DRMs konnte keine signifikante Korrelation zwischen den Resistenzmutationen der klonalen Sequenzanalyse und NGS gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurden Proben aus der RESINA-Kohorte verwendet, von denen durch Populationssequenzierung (nach Sanger) initial bereits ein Resistenzprofil jeweils für die PRRT und die IN Genregion erstellt worden ist. Durch die vergleichende Analyse der kompletten pol-Genregion konnten insgesamt 75 Resistenzmutationen nachgewiesen werden, 99,4 % der Mutationen mittels klonaler Sequenzanalyse und 93,9 % der Mutationen mittels NGS. Anhand der Pearson-Korrelation ergab sich, dass sehr hohe Übereinstimmungen zwischen der klonalen Sequenzanalyse und NGS vorliegen, die Wahrscheinlichkeiten der Co-Varianzanalyse spiegeln die prozentualen Häufigkeiten der Quasispezies wider. Die Mehrheit der Mutationen, die nur in einem der beiden Verfahren nachgewiesen wurden, zeichneten sich dadurch aus, dass sie nur zu einem niedrigen prozentualen Anteil innerhalb der Quasispezies vertreten waren (3,3 % bis 8,8 %). Diese Beobachtung bestätigt, dass die Detektionswahrscheinlichkeit von minoren Virusvarianten, welche nur einen Anteil von <10 % der Viruspopulation ausmachen, auch bei sensitiven Nachweisverfahren deutlich reduziert ist (71, 103). In einer vergleichbaren Studie von Dessilly et. al [72] wurden ebenfalls vereinzelte DRMs beschrieben, die mit NGS nicht nachzuweisen waren. Bereits Poon et al. [104] fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass viele minore Varianten, die auf einem Niveau zwischen 1 % und 5 % nachgewiesen wurden, in einer vergleichenden Analyse nicht nachzuweisen waren. Ein Erklärungsansatz für das Auftreten dieser minore resistenten Varianten in nur einem der beiden Verfahren liegt darin, dass sie durch eine unvollständige Abbildung der Virusvarianten im Sinne eines Stichprobenfehlers bedingt sind [104]. Die HIV-1 Quasispezies ist eine Mischung aus genetisch unterschiedlichen viralen Varianten, welche sich im Rahmen der Virusvermehrung in einem Patienten entwickeln. Für beide Verfahren, die in dieser Arbeit verglichen wurden, ist zu berücksichtigen, dass die Quasispezies bei der Sequenzierung via PCR einen Bias durch unterschiedlich spezifische Primer-Bindung an einzelne Virusvarianten bedingen können [105, 106].

Eine weitere Limitation der PCR-basierten Sequenzanalyse ist die Verwendung von Enzymen ohne Reparaturfunktion, sowohl bei der reversen Transkription als auch bei der Amplifikation der Genprodukte, wodurch bei der PCR ebenfalls Sequenzfehler auftreten können [105].

Hochsensitive PCR-abhängige Sequenzieretechniken wie NGS besitzen die Eigenschaft, auch eine hohe Rate an Falsch-Positiven DRMs zu erzeugen, dies gilt insbesondere für niederfrequente Varianten [105-108]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die NGS Sequenzierfehlerrate, welche zwischen 0,05 % und 1 % eingestuft wird, einen Einfluss auf Mutationen hat, die nur mit einem Verfahren detektiert werden [107-111]. Die NGS Fehlerrate kann durch eine Wiederholung der Sequenzierung mittels NGS erkannt werden, wenn die erneute Sequenzierung die auffälligen resistenten niederfrequenten Varianten nicht mehr aufweist [105]. Die Wiederholung von auffälligen Abweichungen, die nur mittels NGS detektiert wurden, erfolgte in dieser Arbeit nicht. Daher ist nicht sicher auszuschließen, ob minore resistente Varianten die nur mittels NGS detektiert wurden, aufgrund technischer Fehler zu erklären sind oder echte DRMs auf niedrigem Niveau darstellen.

In der Arbeit von Varghese et al. [107] wurde die klonale Analyse verwendet, um DRM von 1 % mittels NGS als falsch-positives Ergebnis einzustufen, sofern mittels CBS kein Nachweis erbracht werden konnte. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Mutation 90M in einer Probe wurde nur mittels NGS nachgewiesen (8,8 % vs. 0 %). Sofern sie nicht als Falsch-Positives Ergebnis zu werten ist, stellt 90M eine echte minore resistente Variante dar, die nur mittels NGS und nicht mittels CBS nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit ergab, dass die klonale Analyse die Möglichkeit bieten kann, insbesondere solche Mutationen zu verifizieren, die als minore resistente Varianten mittels NGS detektiert wurden. Zur weiteren Verifizierung von abweichenden minoren resistenten Varianten bedarf es weiterführender Arbeiten, die insbesondere die weitere Entwicklung der HIV-1 Quasispezies des jeweiligen Patienten analysieren.

Neben den bereits erläuterten Faktoren könnte die gewählte Anzahl an Klonen in dieser Arbeit als methodische Ursache einen weiteren Erklärungsansatz für das Vorkommen von hohen Abweichungen zwischen den Verfahren darstellen. Aus dem gewählten Patientenkollektiv wurden 300 Klone (je Probe a 30 Klone) ge-

wählt, um die Quasispezies für jede Probe abzubilden. Diese methodische Einschränkung ist insbesondere bei den Mutationen die prozentual häufiger mittels Klonierung als mittels NGS nachgewiesen wurden, kritisch zu betrachten und stellt eine naheliegende Ursache für die ermittelten Abweichungen dar. Es ist davon auszugehen, dass bei einer größeren Anzahl an Klonen, die Detektionshäufigkeiten von CBS näher an den Detektionshäufigkeiten von NGS liegen würden, wovon insbesondere die mittelgradigen Abweichungen betroffen wären (z.B. 54L, 82S, 88S, 70R, 92Q). Bei diesem Aspekt ist hervorzuheben, dass die gewählte Anzahl an Klonen mit 30 Klonen für jeden Patienten einen großen labor-technischen Aufwand bedeutet, jedoch spiegelt sich dies auch in den überzeugenden Klonierungsergebnissen wider. Hinzu kommt, dass die aus dem Patientenkollektiv ausgewählten B-Subtyp Proben, sowohl DRMs in der PRRT-Region, als auch in der IN-Region aufweisen sollten, um mögliche Selektionsunterschiede anhand der Mutationsprofile zu untersuchen.

Das Verfahren der klassischen Sanger-Populationssequenzierung detektiert Resistenzmutationen mit einer Sensitivität von 15 - 20 % [95, 112]. Daraus lässt sich jedoch kein Nachweis über die prozentuale Verteilung der resistenten Virusvarianten in der Quasispezies ableiten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die in NGS und CBS ermittelten DRMs die Anzahl und die Verteilung der resistenten Virusvarianten in der Quasispezies sensitiver und spezifischer darstellen, als die klassische Populationssequenzierung. Von besonderem Interesse sind dabei detektierte minore Varianten, die nicht in der klassischen Sanger-Populationssequenzierung detektiert werden, jedoch mit Medikamenten assoziierten Resistenzen und klinischem Therapieversagen verbunden sind. Beispielsweise ist die Mutation 181C die am häufigsten nachgewiesene Mutation, die mit einer NNRTI-Resistenz nach virologischem Versagen verbunden ist [113]. In dieser Arbeit konnte die 181C Mutation als minore Variante bei Probe 5150 sowohl mittels NGS, als auch mittels CBS nachgewiesen werden, jedoch nicht mit der klassischen Sanger-Populationssequenzierung. Insbesondere aus diesen Mutationen die aufgrund der eingeschränkten Sensitivität der Sanger-Populationssequenzierung nicht erfasst werden, lassen sich für die behandelten Patienten mögliche klinische Therapieentscheidungen ableiten.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von NGS zum Nachweis von DRMs im HIV-1 pol-Gen. Die NGS Methoden stellen ultrasensitive und hocheffiziente Verfahren dar, um DRMs zu detektieren. Die Ergebnisse von NGS sind mit denen der klonale Sequenzanalyse vergleichbar, es kann somit bestätigt werden, dass NGS eine schnelle und sensitive Methode darstellt, welche sowohl die Heterogenität der HIV-1 Quasispezies widerspiegelt und zudem die Detektion von minoren resistente Virusvarianten ermöglicht [72, 101].

4.3 Untersuchung der Koevolution von Resistenzmutationen

Die Analyse der Koevolution von Resistenzmutationen stellt ein wichtiges Ziel der HIV-1 Grundlagenforschung dar. Die Anpassungsfähigkeit des HI-Virus wird bedingt durch die Replikationsrate, die Viruslast, die virale Fitness und die genetische Heterogenität der Quasispezies, dabei werden die hier genannten Parameter durch eine heterogene Quasispezies positiv beeinflusst [114]. Die Evolution der Quasispezies wird bedingt durch hohe Mutationsraten während der Virusreplikation und in einigen Fällen auch durch molekulare Rekombination und Umstrukturierung des Genomsegments [114]. Der medikamentenbedingte Selektionsdruck einer HIV-1 Therapie bedingt die Koevolution der DRMs auf den Genabschnitten von pol (PR, RT, IN) [115, 116]. Die sequentiellen HIV-Therapien bedingen die Entwicklung unterschiedlicher Selektionsmuster. Die Amplifikation und Sequenzierung dieser drei Genregionen (PR, RT, IN) in einem großen Produkt bietet die Möglichkeit festzustellen, inwieweit diverse Mutationen auf den gleichen Virusvarianten selektiert werden, welche die Wahl der antiretroviralen Medikamente in einer Kombinationstherapie steuern kann. Die in dieser Arbeit durch NGS ermittelten Daten, stellen eine spezifische Darstellung der Quasispezies dar und stimmen in einem hohen Maße mit denen durch die klonale Sequenzanalyse ermittelten Daten überein. Die Sequenzierverfahren zeigen minimale Unterschiede im Nachweis der Resistenzmutationen, die Verfahren sind jedoch hinsichtlich der Sensitivität in der Mutationsdetektion vergleichbar. Dadurch ermöglichen sie zum einen die Analyse der Koevolution von Mutationen auf einzelnen viralen Segmenten und zum anderen die Koevolution der Subpopulatio-

nen innerhalb der Quasispezies. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, können aufgrund der Verbindung von PRRT und IN bei der Amplifikation von pol im Ganzen die verschiedenen Virusvarianten der Quasispezies hinsichtlich der Mutationsverteilung auf den einzelnen Virusvarianten innerhalb der Quasispezies untersucht werden. Dass NGS zum Monitoring der Evolution von Quasispezies und zur Bestimmung der Übertragungsrichtung bei Patienten genutzt werden kann, belegen auch Ergebnisse von Yu et al. [117]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen übereinstimmend mit den Ergebnissen von Yu et al., dass sowohl die mit CBS, als auch die mit NGS ermittelten Mutationen die Quasispezies abbilden und die Möglichkeit bieten, die Koevolution innerhalb der Quasispezies zu analysieren. Dadurch kann die tatsächliche Resistenzsituation beurteilt werden, indem eine Aussage getroffen werden kann, welche Resistenzmutationen auf gleichen Virusstämmen selektiert wurden. Die Betrachtung der Koevolution bietet eine Möglichkeit, um eine individualisierte Therapieoptimierung vorzunehmen. Aufgrund der Fokussierung in dieser Arbeit auf die Untersuchung der DRMs der Quasispezies durch NGS, werden weitere, insbesondere longitudinale Untersuchungen benötigt, um die Koexistenz und die Koevolution der Resistenzmutationen zu untersuchen.

4.4 Klinische Bedeutung der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit konnte die Amplifikation des kompletten HIV-1 pol-Gens durch Optimierung der bisherigen und klinisch etablierten PCR Verfahren erreicht werden. Insbesondere eine spezifische Amplifikation des kompletten pol-Gens, bestehend aus den PRRT und IN Genen, wurde HIV-1 subtypenübergreifend ermöglicht. Dies wurde zum einen durch die Optimierung der PCR-Protokoll Parameter erreicht und zum anderen durch die erstmalige Verwendung von T4gp32 zur Stabilisierung der PCR. Das optimierte Protokoll stellt einen neu entwickelten genotypischen HIV-1 Resistenztest dar, welcher es ermöglicht in der klinischen Routine auch bei Patienten mit niedrigen HI-Viruslasten und unterschiedlichen HIV-1 Subtypen HIV-1 pol als Ganzes zu amplifizieren. Das All-in-one pol-PCR Protokoll bietet den Vorteil, dass sowohl die Arbeitszeit, als auch die Kosten reduziert werden. Darüber hinaus wird bei jeder All-in-one pol-PCR die IN mit analysiert und dadurch ein Resistenzprofil von der Integrase ohne zusätzliche Kosten

erstellt. Neuzugelassene IN-Inhibitoren wie Dolutegravir und Lamivudin verstärken die klinische Relevanz der Betrachtung des Resistenzprofils der Integrase und werden auch zukünftig von besonderer Bedeutung sein.

Die Limitation dieser Arbeit besteht für die Optimierung der pol-PCR in der eingeschränkten Diversität an HIV-1 Subtypen. Das Protokoll wurde ausgehend von B-Subtypen optimiert und dann auf die Non-B-Subtypen erweitert. Auch für die Untersuchung der Verteilung innerhalb der Quasispezies wurden B-Subtypen verwendet. In weiteren Arbeiten sollten die Erkenntnisse auf eine größere Anzahl an Non-B-Subtypen angewendet werden, dazu sollte auch die Bestimmung der Verteilungshäufigkeiten der Quasispezies via NGS bei Non-B-Subtypen untersucht werden. Die mit dem All-in-one pol-PCR-Protokoll amplifizierten Genabschnitte wurden mit den neuen NGS Verfahren auf die Verteilung der resistenten Virusvarianten untersucht. Die Verteilungsdaten des CBS der gleichen pol-Produkte, zeigte signifikante Übereinstimmung zwischen den prozentualen Häufigkeiten in den jeweiligen Quasispezies und bestätigte die ermittelte Verteilung durch NGS. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NGS besonders zeitsparend und gut geeignet ist, um die Häufigkeiten der resistenten Virusvarianten in der jeweiligen HIV-1 Quasispezies eines Patienten zu analysieren. Die DRMs die in der klassischen Sanger-Populationssequenzierung aufgrund der eingeschränkten Sensitivität nicht detektiert wurden, konnten mittels NGS nachgewiesen werden. Diese können klinisch unmittelbaren Einfluss auf die Behandlung der jeweiligen Patienten haben, indem die jeweiligen Therapieschemata hinsichtlich der Resistenzen abgeglichen und ggf. angepasst werden. Retrospektiv kann sich dann auch der Frage nach dem Einfluss der minoren resistenten Varianten auf das Therapieansprechen gewidmet werden, welcher in zukünftigen Therapiestrategien berücksichtigt werden kann.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. UNAIDS, *Global AIDS Data 2019*. 2019: Schweiz.
2. Robert-Koch-Institut, *HIV im Jahr 2019 in Deutschland: Neuinfektionen und Gesamtkrankheitslast*, in *Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Epidemiologisches Bulletin 2020/48*. 2020.
3. Hill, A. and A. Pozniak, *HIV treatment cascades: how can all countries reach the UNAIDS 90-90-90 target?* AIDS, 2015. **29**(18): p. 2523-5.
4. Yamaguchi, J., et al., *Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2020. **83**(3): p. 319-322.
5. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**(5463): p. 55-6.
6. Abecasis, A.B., et al., *HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 7.
7. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin Nr. 49/2019*, Robert-Koch-Institut, Editor. 2019.
8. Hauser, A., et al., *Increasing proportions of HIV-1 non-B subtypes and of NNRTI resistance between 2013 and 2016 in Germany: Results from the national molecular surveillance of new HIV-diagnoses*. PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0206234.
9. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin 45 / 2016*. 2016, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
10. Zhu, T., et al., *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 594-7.
11. Oette, M., *Resistenz in der HIV-Therapie - Diagnostik und Management*. 2009, Bremen: UNI-MED Verlag.
12. Nermut, M.V., et al., *Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency virus*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(10): p. 929-38.
13. Webster, R.G., *Encyclopedia of virology / Bd. 2 : [G - Pars]*, ed. R.G. Webster. 1994, London u.a.: Acad. Press.
14. Steckbeck, J.D., A.S. Kuhlmann, and R.C. Montelaro, *C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 1): p. 1-19.
15. Auewarakul, P., et al., *Uncoating of HIV-1 requires cellular activation*. Virology, 2005. **337**(1): p. 93-101.
16. Narayan, S. and J.A. Young, *Reconstitution of retroviral fusion and uncoating in a cell-free system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7721-6.
17. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
18. Nkeze, J., et al., *Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Cell Biosci, 2015. **5**: p. 47.
19. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.

20. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
21. Huang, Y., et al., *Primer tRNA³Lys on the viral genome exists in unextended and two-base extended forms within mature human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 726-8.
22. Katz, R.A. and A.M. Skalka, *The retroviral enzymes*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 133-73.
23. Wang, J., et al., *Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7242-6.
24. Peliska, J.A. and S.J. Benkovic, *Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1992. **258**(5085): p. 1112-8.
25. Brown, P.O., *Integration of retroviral DNA*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **157**: p. 19-48.
26. Bushman, F.D., T. Fujiwara, and R. Craigie, *Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro*. Science, 1990. **249**(4976): p. 1555-8.
27. Van Maele, B. and Z. Debyser, *HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins*. AIDS Rev, 2005. **7**(1): p. 26-43.
28. Haffar, O.K., et al., *Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. J Mol Biol, 2000. **299**(2): p. 359-68.
29. Vink, C., R.A. Lutzke, and R.H. Plasterk, *Formation of a stable complex between the human immunodeficiency virus integrase protein and viral DNA*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(20): p. 4103-10.
30. Engelman, A., K. Mizuuchi, and R. Craigie, *HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1211-21.
31. Bushman, F.D. and R. Craigie, *Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1339-43.
32. Yoder, K.E. and F.D. Bushman, *Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11191-200.
33. Esposito, D. and R. Craigie, *HIV integrase structure and function*. Adv Virus Res, 1999. **52**: p. 319-33.
34. AIDS-Gesellschaft, D., *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion*. 2015.
35. EACS. *EACS Leitlinien 2019*. 11/2019; Version 10.0:[Available from: https://www.eacsociety.org/files/guidelines-10.0_final_german.pdf].
36. Vogel, M. and J.K. Rockstroh, *[Chronic HIV infection. Current therapeutic aspects]*. Internist (Berl), 2007. **48**(5): p. 519-24; quiz 525.
37. Emmelkamp, J.M., *Die Klinik der HIV-Infektion : eine Analyse der RESINA-Kohorte*, ed. J.M. Emmelkamp. 2015, Düsseldorf: Dup, Düsseldorf Univ. Press.
38. Marcus, U., M.T. Dittmar, and H.G. Krausslich, *HIV: epidemiology and strategies for therapy and vaccination*. Intervirology, 2002. **45**(4-6): p. 260-6.

39. Vogel, M., et al., *The treatment of patients with HIV*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(28-29): p. 507-15; quiz 516.
40. Cohen, P.T., *The AIDS knowledge base : a textbook on HIV disease*. 3. ed. ed, ed. P.T. Cohen and University. 1999, Philadelphia u.a.: Lippincott Williams & Wilkins.
41. Aitken, S.C., et al., *Development and evaluation of an assay for HIV-1 protease and reverse transcriptase drug resistance genotyping of all major group-M subtypes*. J Clin Virol, 2012. **54**(1): p. 21-5.
42. Abram, M.E., et al., *Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9864-78.
43. Mansky, L.M., *HIV mutagenesis and the evolution of antiretroviral drug resistance*. Drug Resist Updat, 2002. **5**(6): p. 219-23.
44. Keele, B.F., et al., *Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7552-7.
45. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
46. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. Science, 1995. **267**(5197): p. 483-9.
47. Hu, W.S. and H.M. Temin, *Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1556-60.
48. Levy, D.N., et al., *Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4204-9.
49. Salzberger, B., *Aktuelle HIV-Therapie*. 2. Aufl. ed, ed. B. Salzberger and G. Fätkenheuer. 2004, Bremen u.a.: UNI-MED.
50. De Luca, A., *The impact of resistance on viral fitness and its clinical implications*, in *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*, A.M. Geretti, Editor. 2006: London.
51. Silver, N., et al., *Characterization of minority HIV-1 drug resistant variants in the United Kingdom following the verification of a deep sequencing-based HIV-1 genotyping and tropism assay*. AIDS Res Ther, 2018. **15**(1): p. 18.
52. Parikh, U.M., et al., *Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure*. Curr Opin HIV AIDS, 2017. **12**(2): p. 182-189.
53. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications*. Drugs, 2012. **72**(9): p. e1-25.
54. Mitsuya, Y., et al., *HIV-1 drug resistance genotype results in patients with plasma samples with HIV-1 RNA levels less than 75 copies/mL*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **43**(1): p. 56-9.
55. Zhang, J., et al., *Comparison of the precision and sensitivity of the Antivirogram and PhenoSense HIV drug susceptibility assays*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **38**(4): p. 439-44.
56. *QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge*. [Handbook] 2008 03/2008]; Available from: http://2012.igem.org/wiki/images/a/a3/QIAquick_PCR-purification.pdf.
57. Lee, J.H., et al., *Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory*. Yonsei Med J, 2010. **51**(1): p. 104-10.

58. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
59. *QIAprep® Miniprep Handbook*. 2015. p. 20-21.
60. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
61. Geretti, A.M., et al., *Sensitive testing of plasma HIV-1 RNA and Sanger sequencing of cellular HIV-1 DNA for the detection of drug resistance prior to starting first-line antiretroviral therapy with etravirine or efavirenz*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(4): p. 1090-7.
62. Smith, L.M., et al., *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. Nature, 1986. **321**(6071): p. 674-9.
63. Prober, J.M., et al., *A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides*. Science, 1987. **238**(4825): p. 336-41.
64. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
65. Bahassi el, M. and P.J. Stambrook, *Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics*. Mutagenesis, 2014. **29**(5): p. 303-10.
66. Mardis, E.R., *Next-generation sequencing platforms*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2013. **6**: p. 287-303.
67. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
68. Bentley, D.R., et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 53-9.
69. Villalva, C., et al., *Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 81-3, 86.
70. Baugh, L.R., et al., *Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. E29.
71. Piche, C. and J.P. Scherthaner, *Optimization of in vitro transcription and full-length cDNA synthesis using the T4 bacteriophage gene 32 protein*. J Biomol Tech, 2005. **16**(3): p. 239-47.
72. Dessilly, G., et al., *First evaluation of the Next-Generation Sequencing platform for the detection of HIV-1 drug resistance mutations in Belgium*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0209561.
73. Reuter, S., et al., *Changes in the HIV-1 mutational profile before first-line HAART in the RESINA cohort*. J Med Virol, 2011. **83**(2): p. 187-95.
74. Heger, E., et al., *Development of a phenotypic susceptibility assay for HIV-1 integrase inhibitors*. J Virol Methods, 2016. **238**: p. 29-37.
75. Hutape, H.M.L., Y. Maladan, and Widodo, *Relationship between HIV integrase polymorphisms and integrase inhibitor susceptibility: An in silico analysis*. Heliyon, 2018. **4**(12).
76. Van den Eede, P., et al., *HIV-1 genotyping of the protease-reverse transcriptase and integrase genes to detect mutations that confer antiretroviral resistance*. Methods Mol Biol, 2013. **1030**: p. 37-55.
77. Bleiber, G., et al., *Individual contributions of mutant protease and reverse transcriptase to viral infectivity, replication, and protein maturation of antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2001. **75**(7): p. 3291-300.

78. Briones, C., et al., *Dynamics of dominance of a dipeptide insertion in reverse transcriptase of HIV-1 from patients subjected to prolonged therapy*. *Virus Res*, 2000. **66**(1): p. 13-26.
79. Eshleman, S.H., et al., *Analysis of pol integrase sequences in diverse HIV type 1 strains using a prototype genotyping assay*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2009. **25**(3): p. 343-5.
80. Yang, C., et al., *Development and application of a broadly sensitive dried-blood-spot-based genotyping assay for global surveillance of HIV-1 drug resistance*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(9): p. 3158-64.
81. Zhou, Z., et al., *Optimization of a low cost and broadly sensitive genotyping assay for HIV-1 drug resistance surveillance and monitoring in resource-limited settings*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e28184.
82. Cohen, C., *Low-level viremia in HIV-1 infection: consequences and implications for switching to a new regimen*. *HIV Clin Trials*, 2009. **10**(2): p. 116-24.
83. Villahermosa, M.L., et al., *Improved conditions for extraction and amplification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma samples with low viral load*. *J Hum Virol*, 2000. **3**(1): p. 27-34.
84. Mens, H., et al., *Amplifying and quantifying HIV-1 RNA in HIV infected individuals with viral loads below the limit of detection by standard clinical assays*. *J Vis Exp*, 2011(55).
85. Hatano, H., et al., *Evidence of persistent low-level viremia in long-term HAART-suppressed, HIV-infected individuals*. *AIDS*, 2010. **24**(16): p. 2535-9.
86. Dudley, D.M., et al., *Cross-clade simultaneous HIV drug resistance genotyping for reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitor mutations by Illumina MiSeq*. *Retrovirology*, 2014. **11**: p. 122.
87. Gupta, S., et al., *A Robust PCR Protocol for HIV Drug Resistance Testing on Low-Level Viremia Samples*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 4979252.
88. Christopherson, C., J. Sninsky, and S. Kwok, *The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(3): p. 654-8.
89. Margariti, A., et al., *Comparing Abbott m2000 RealTime HIV test and Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV test, v2.0 in treated HIV-1 B and non-B subjects with low viraemia*. *J Med Virol*, 2016. **88**(4): p. 724-7.
90. Eshleman, S.H., et al., *Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(6): p. 2711-7.
91. Aghokeng, A.F., et al., *High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(4): p. 1635-41.
92. Gibson, R.M., C.L. Schmotzer, and M.E. Quinones-Mateu, *Next-Generation Sequencing to Help Monitor Patients Infected with HIV: Ready for Clinical Use?* *Curr Infect Dis Rep*, 2014. **16**(4): p. 401.
93. Arias, A., et al., *Sanger and Next Generation Sequencing Approaches to Evaluate HIV-1 Virus in Blood Compartments*. *Int J Environ Res Public Health*, 2018. **15**(8).

94. Liang, B., et al., *A comparison of parallel pyrosequencing and sanger clone-based sequencing and its impact on the characterization of the genetic diversity of HIV-1*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26745.
95. Tzou, P.L., et al., *Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(6).
96. Noguera-Julian, M., et al., *Next-Generation Human Immunodeficiency Virus Sequencing for Patient Management and Drug Resistance Surveillance*. J Infect Dis, 2017. **216**(suppl_9): p. S829-S833.
97. Cozzi-Lepri, A., et al., *Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(3): p. 930-40.
98. Stella-Ascariz, N., et al., *The Role of HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants in Treatment Failure*. J Infect Dis, 2017. **216**(suppl_9): p. S847-S850.
99. Howden, B.P., et al., *Evolution of multidrug resistance during Staphylococcus aureus infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002359.
100. Quan, P.L., et al., *Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8194-9.
101. Beerenwinkel, N., et al., *Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 329.
102. Raymond, S., et al., *Performance evaluation of the Vela Dx Sentosa next-generation sequencing system for HIV-1 DNA genotypic resistance*. J Clin Virol, 2020. **122**: p. 104229.
103. Weber, J., et al., *Prospective Evaluation of the Vela Diagnostics Next-Generation Sequencing Platform for HIV-1 Genotypic Resistance Testing*. J Mol Diagn, 2019. **21**(6): p. 961-970.
104. Poon, A.F., et al., *Phylogenetic analysis of population-based and deep sequencing data to identify coevolving sites in the nef gene of HIV-1*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(4): p. 819-32.
105. Gianella, S., et al., *Detection of minority resistance during early HIV-1 infection: natural variation and spurious detection rather than transmission and evolution of multiple viral variants*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 8359-67.
106. Huse, S.M., et al., *Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing*. Genome Biol, 2007. **8**(7): p. R143.
107. Varghese, V., et al., *Nucleic acid template and the risk of a PCR-Induced HIV-1 drug resistance mutation*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10992.
108. Wang, C., et al., *Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance*. Genome Res, 2007. **17**(8): p. 1195-201.
109. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
110. Varghese, V., et al., *Minority variants associated with transmitted and acquired HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: implications for the use of second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **52**(3): p. 309-15.

111. Zagordi, O., et al., *Deep sequencing of a genetically heterogeneous sample: local haplotype reconstruction and read error correction*. J Comput Biol, 2010. **17**(3): p. 417-28.
112. Mohamed, S., et al., *Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure*. AIDS, 2014. **28**(9): p. 1315-24.
113. Li, J.Z., et al., *Impact of minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations on resistance genotype after virologic failure*. J Infect Dis, 2013. **207**(6): p. 893-7.
114. Domingo, E., J. Sheldon, and C. Perales, *Viral quasispecies evolution*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 159-216.
115. Li, G., et al., *A new ensemble coevolution system for detecting HIV-1 protein coevolution*. Biol Direct, 2015. **10**: p. 1.
116. Knops, E., et al., *The evolution of protease mutation 76V is associated with protease mutation 46I and gag mutation 431V*. AIDS, 2010. **24**(5): p. 779-81.
117. Yu, F., et al., *The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1404.

6 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum März 2017 bis Oktober 2017 am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle:

Herrn **Professor Dr. Jörg Timm**, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Frau **Dr. Nadine Lübke**, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Insbesondere gilt ihr mein Dank für die herzliche Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Überlegungen, Ratschläge, Denkansätze und motivierenden Worte.

Meiner „AG Lübke“, hierbei danke ich besonders Frau **Iris Herrmann** und Frau **Jennifer Camdereli**, dass sie mir so gut zugearbeitet haben, ich das Privileg hatte ihre Arbeitsplätze und Geräte mit zu benutzen und dass sie mich und meine Nachfragen stets mit einem Lächeln ertragen haben.

Frau **Wiebke Moskorz**, für die liebevolle Einarbeitung ins Thema, ins 1 x 1 der Laborarbeit und dass sie jederzeit ein offenes Ohr für meine Nachfragen und Ideen hatte.

Herrn **Dr. Andreas Walker**, der mit zahlreichen Ratschlägen und Anmerkungen zum Gelingen und stetigen Vorankommen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau **Kim Sophie Ennker**, die beste Kommilitonin die man sich als Doktorand im Leben und im Labor wünschen kann.

Herrn **Dr. Alexander Thielen** (Seq IT GmbH & Co.KG, Kaiserslautern) für die Unterstützung bei der Erstellung der entsprechenden Graphiken.

Herrn **Dominik Walther Zielinski** (Department Mathematik/Informatik der Universität zu Köln) für seine fachkundliche Unterstützung und die motivierenden Worte.

Der AG Schaal und all ihren Fans, insbesondere **Frank Hillebrand, Lara Wlotka, Lisa Müller, Aljoscha Tersteegen, Philipp Ostermann, Johannes Ptok, Björn Wefers, Ramona Grothmann** und **Mareike Brettschneider**, die mich so liebevoll in ihre Gemeinschaft aufgenommen haben und mit denen die unzähligen Abende, sowie der AG Ausflug unvergesslich bleiben.

Den lieben Kommilitonen und Kommilitoninnen **Tobias Sondermann, Elias Kortenbruck** und **Livia Schmidt** für die gemeinsame Zeit und die schönen Stunden beim GfV Workshop Klinisch-Virologische Forschung in Zeilitzheim.

Frau **Aglaia-Maria Klose**, Frau **Hellen Lesmann** und Frau **Elisa Pracht**, die mich stets bei meiner Arbeit, meinen Entscheidungen und meinem Studium unterstützt haben. Danke für die ganz besondere Freundschaft und die gemeinsame Zeit in Düsseldorf.

Meiner Ehefrau **Anica Lina Frese** und meiner Familie, die mich stets ermutigt haben das Studium der Medizin aufzunehmen und auch erfolgreich zu beenden. Insbesondere meiner Mutter **Regina Bilstein**, meiner Schwester **Lea Mareen Folgnandt** und meiner Tante **Barbara Bilstein**, für die umfangreiche medizinische Expertise und die motivierenden Worte. Ebenso meinem Vater **Michael Folgnandt**, für die Geduld und die Unterstützung auf meinem Weg. Sowie meinen Schwiegereltern **Thomas** und **Jutta Frese** für die Anmerkungen und die finale Durchsicht.

Frau **Regina Roß**, die mein Interesse an der Medizin geweckt hat und mir durch ihre begnadete Lehre erst ein Studium ermöglichte

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Virologie für die angenehme Zusammenarbeit, sowie für die gute und zahlreiche Unterstützung.