

Aus dem Fachbereich Medizin der
Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Virologie
(Direktor: Professor Dr. med. H. W. Doerr)

**Erstellung und Auswertung der
Frankfurter HIV-Resistenzdatenbank:
Korrelation von Punktmutationen in der Protease
mit klinischen Parametern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Medizin der
Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von:
Yvonne Hermschulte
aus Mainz

Frankfurt am Main, 2007

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. H. W. Doerr

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Kreuz

Termin der Disputation: 07.11.2008

Meinen Eltern, Hannelore und Werner Laitschek, gewidmet

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation in vielfältiger Weise unterstützt haben, insbesondere bei

- Herrn Prof. Dr. H. W. Doerr für die Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit
- Herrn Dr. M. Stürmer für die Einarbeitung in die Thematik sowie die intensive und immer besonders nette Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können
- allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie für ihre bereitwillige Kooperation
- der Gemeinschaftspraxis Drs. Gute, Locher, Lutz, die mir während meiner Famulatur in ihrer Praxis einen Einblick in die klinischen Belange der HIV-Infektion gewährt haben
- meiner Kommilitonin und Freundin, Nora Hanke, für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit
- meiner Familie und meiner Freundin, Dr. Marianne Schüz, die mich immer wieder dazu ermutigt und darin unterstützt haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	9
2	Einleitung	11
2.1	Historie	11
2.2	Aufbau des HI-Virus	12
2.3	Replikationszyklus	14
2.4	Epidemiologie	15
2.5	Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	17
2.6	Übertragung von HIV	20
2.7	Therapie der HIV-Infektion	21
	2.7.1 Antiretrovirale Medikamente	22
	2.7.1.1 Nukleosidartige Reverse Transkriptase Inhibitoren	22
	2.7.1.2 Nicht-Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren	23
	2.7.1.3 Protease Inhibitoren	24
	2.7.1.4 Fusionsinhibitoren	27
2.8	Aufbau und Funktion der Protease	27
2.9	Entstehung von Mutationen und Resistenzentwicklung	28
	2.9.1 Resistenzen der Protease	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Patientenkollektiv	31
3.2	Genotypisierung	31
3.3	Datenbank	35
3.4	Jahresauswertungen	35
3.5	Spezifische Patientenauswertungen	35
3.6	Low-Level-Auswertung	35
	3.6.1 Patientenverläufe	36

4	Ergebnisse	37
4.1	Allgemeine Auswertung der Datenbank	37
4.2	Jahresauswertungen	41
4.3	Low-Level-Auswertungen	50
4.4	Patientenverläufe	52
4.5	Veränderungen der Mutationen	56
5	Diskussion	60
5.1	Allgemeine Datenbankauswertung	61
5.1.1	Primärmutationen	61
5.1.2	Sekundärmutationen	69
5.1.3	Jahresauswertungen	73
5.2	Mutationsentwicklungen	77
5.3	Low-Level-Auswertung	79
5.3.1	Resistenz-Entwicklung unter Nelfinavir-Therapie	80
5.3.2	Patientenverläufe	82
5.4	Veränderungen der Mutationen	87
5.5	Schlussbemerkung	91
6	Zusammenfassung.....	92
6.1	Abstract.....	94
7	Literaturverzeichnis.....	96
	Lebenslauf	118
	Ehrenwörtliche Erklärung	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV	11
Abb. 2:	Molekulare Struktur des HI-Virus	12
Abb. 3:	Replikationszyklus von HIV	14
Abb. 4:	Verteilung der HIV-Infektion weltweit	15
Abb. 5:	Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	16
Abb. 6:	Struktur der HIV-1 PR	26
Abb. 7:	Lage der PCR- und Sequenzierungsprimer im ViroSeq	33
Abb. 8:	Verteilung von Wildtyp und Mutationen auf mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen	36
Abb. 9:	Verteilung von Wildtyp und Mutationen bezogen auf die jeweilige AS-Position	37
Abb. 10:	Zeitliche Entwicklung der Mutationsprävalenzen aller mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen	40
Abb. 11:	Jahresbetrachtung AS 30	41
Abb. 12:	Jahresbetrachtung AS 46	43
Abb. 13:	Jahresbetrachtung AS 48	44
Abb. 14:	Jahresbetrachtung AS 82	46
Abb. 15:	Jahresbetrachtung AS 84	47
Abb. 16:	Jahresbetrachtung AS 90	48
Abb. 17:	Low-Level-Patienten	49
Abb. 18:	VL- und CD4 ⁺ -Verläufe – Patient 1	52
Abb. 19:	VL- und CD4 ⁺ -Verläufe – Patient 2	54
Abb. 20:	Prävalenzänderungen bei Therapiepausen	58

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Infektionssituation in Deutschland	15
Tab. 2:	Stadieneinteilung der HIV-Infektion nach CDC-Klassifikation	19
Tab. 3:	Strukturformel von Abacavir	22
Tab. 4:	Strukturformel von Viramune	23
Tab. 5:	Strukturformeln der klinisch zugelassenen PIs	23
Tab. 6:	Darstellung der Primär- und Sekundärmutationen für die PIs	29
Tab. 7:	Zeitliche Verteilung der Patientenproben	30
Tab. 8:	Auswertung aller AS-Positionen der Datenbank	38
Tab. 9:	Jahresbetrachtung AS 30	41
Tab. 10:	Jahresbetrachtung AS 46	42
Tab. 11:	Jahresbetrachtung AS 48	44
Tab. 12:	Jahresbetrachtung AS 82	45
Tab. 13:	Jahresbetrachtung AS 84	46
Tab. 14:	Jahresbetrachtung AS 90	47
Tab. 15:	Verteilung der Sekundärmutationen bei PI-naiven Patienten	50
Tab. 16:	Primärmutationen bei Low-Level-Patienten	50
Tab. 17:	Entwicklung der Mutationen – Patient 1	53
Tab. 18:	Entwicklung der Mutationen – Patient 2	54
Tab. 19:	Veränderungen der Mutationen	55
Tab. 20:	Mit Resistenzen assoziierte AS-Positionen	60

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

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

AIDS:	engl. Aquired Immunodeficiency Syndrome
APV:	Amprenavir
ART:	Antiretrovirale Therapie
AS:	Aminosäure
CD:	engl. Cluster of differentiation
CDC:	engl. Center for Disease Control
cDNA:	engl. Copy deoxynucleic acid
DNA:	engl. Deoxyribonucleic acid
FI:	Fusionsinhibitor
FOV:	Fortovase
INT:	Integrase
INV:	Invirase
HAART:	engl. Highly Active Antiretroviral Therapy

HIV-1/2:	Humanes Immundefizienz-Virus Typ ½
IDV:	Indinavir
LPV/r:	Kaletra
Mut.	Mutation(en)
NFV:	Nelfinavir
NNRTI:	Nicht-Nukleosidaler Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI:	Nukleosidaler Reverse Transkriptase Inhibitor
PCR:	engl. Polymerase chain reaction
PI:	Protease Inhibitor
PM:	Primärmutation
PR:	Protease
RT:	Reverse Transkriptase
RTI:	Reverse Transkriptase Inhibitor
RTV:	Ritonavir
RKI:	Robert-Koch-Institut
RNA:	engl. Ribonucleic acid
Seq.:	Sequenzierung
SQV:	Saquinavir
STI:	engl. Structured therapy interruption
TW:	Therapiewechsel
UNAIDS:	engl. Joint UN program on HIV / AIDS
VL:	Viruslast
WHO:	engl. World Health Organisation

2 EINLEITUNG

2.1 Historie

Im Jahre 1981 wurde in den USA die Medizin erstmals auf ein Krankheitsbild aufmerksam, das sich in Form von ungewöhnlichen bzw. seltenen Infektionserkrankungen darstellte, z. B. Pneumonien durch den für immunkompetente Personen harmlosen Keim *Pneumocystis carinii* oder dem Karposi-Sarkom. Sie zeigten sich zunächst bei männlichen Homosexuellen, bei i. v.-Drogenabhängigen sowie bei Hämophilie-Patienten (*Centers for Disease Control, 1981*). Allen Patienten gemeinsam war eine deutliche Reduktion der Anzahl der CD4-positiven T-Helferzellen, die man für die Schwächung des Immunsystems hauptverantwortlich machte (*Gottlieb et al., 1981*). Dies führte 1982 zu der Begriffsbildung des erworbenen Immunschwäche-Syndroms, besser bekannt unter der englischen Abkürzung AIDS (acquired immune deficiency syndrome).

Als Verursacher dieses Krankheitskomplexes konnten erstmals 1983 Luc Montanier und kurze Zeit später Robert Gallo Viren isolieren (*Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984*), die später als Humane Immundefizienz-Viren (HIV) bezeichnet wurden.

HIV wird unterteilt in HIV-1, das weltweit als hauptsächlicher Erreger der HIV-Erkrankung gefunden wird, und HIV-2, welches im Wesentlichen in Westafrika und Indien endemisch ist. Bei HIV-1 erfolgt eine weitere Einteilung in die Gruppen M (main), O (outlier) and N (non-M, non-O). Weltweit werden die meisten Infektionen durch Viren der Gruppe M hervorgerufen. Innerhalb dieser Gruppe wurden bisher 9 Subtypen klassifiziert, A – D, F - H, J und K, von denen man annimmt, dass sie alle ihren Ursprung in Zentral-Afrika haben (*Thomson et al., 2002*). Zu Beginn der neunziger Jahre wurden erstmals rekombinante Varianten von HIV-1 isoliert, deren Genom aus Teilen mehrerer zuvor definierter Subtypen zusammengesetzt war (*Negroni and Buc, 2000*).

Die Annahme, dass HIV-1 ursprünglich von Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde, zeigt sich darin begründet, dass aus der Schimpansenart *Pan troglodytes troglodytes* ein Retrovirus isoliert werden konnte, das eine starke genetische Homologie zum menschlichen HIV-1 Virus aufweist. Diese Affenart kommt insbesondere in Gebieten vor, in denen auch HIV-1 Infektionen weit verbreitet sind. Die Menschen wurden vermutlich durch das Essen bzw. Verarbeiten von Schimpansenfleisch mit dem Virus infiziert (*Gao et al., 1999*). HIV-2 konnte durch seinen Genotyp als ein näherer Verwandter des affenspezifischen >>simian immunodeficiency virus<< (SIV) charakterisiert werden. Man nimmt daher an, dass der Ursprung von HIV in Afrika zu suchen ist, wo es zur Übertragung dieser Affenviren auf den Menschen kam (*Hirsch et al, 1989; Gao et al., 1994*).

2.2 Aufbau des HI-Virus

Abbildung 1 zeigt die morphologische Struktur von HIV, die mittels Elektronenmikroskopie aufgeklärt werden konnte (*Gelderblom et al., 1992*).

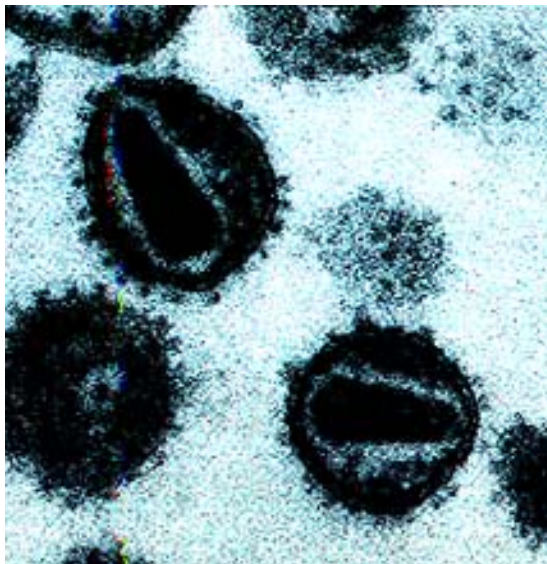


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV.
(Quelle: Abteilung für Mikrobiologie der Universität von Otago, Neuseeland)

Bei dem HI-Virus handelt es sich um ein Retrovirus aus der Gruppe der Lentiviren. Typisch für die Gruppe der Retroviren ist das Vorhandensein des Enzyms Reverse

Transkriptase (RT), mit dessen Hilfe die virale RNA in provirale DNA transkribiert wird. Die äußere Hülle von HIV besteht aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen, die dem Membransystem der menschlichen Wirtszelle ähnelt, und ist u. a. mit den Histokompatibilitäts-Antigenen MHC-I und MHC-II besetzt. Die aus der Hülle ragenden Spikes werden aus den Hüllproteinen gp120 und deren Transmembranteil gp41 gebildet (Abbildung 2) und spielen bei der Adsorption des Virus und der Penetration in die Zielzelle eine entscheidende Rolle. Direkt an die Hülle schließt sich eine Schicht aus dem Matrixprotein p17 an. Diese Matrix umschließt das Kapsid, den Kernbereich des Virus, welches aus dem Protein p24 besteht. Im Nucleokapsid des Virus befindet sich das HIV-Genom in Form von zwei RNA-Strängen. Damit assoziiert sind die drei für die virale Replikation essentiellen viralen Enzyme RT, Integrase (INT) und Protease (PR) sowie vier weitere Proteine. Das ca. zehn Kilobasen umfassende einsträngige HIV-RNA-Genom enthält neben den drei für die Replikation essentiellen Genen *gag* (p7, p9, p17, p24), *env* (gp 120, gp 41) und *pol* (RT, PR, INT), mindestens sechs weitere Gene (*tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *vif*, *nef*). Diese besitzen vorwiegend regulatorische Funktionen im Replikationszyklus von HIV.

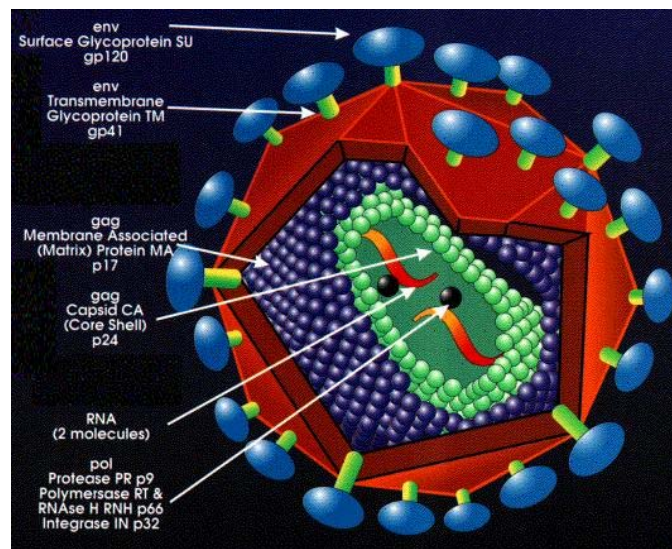


Abb. 2: Molekulare Struktur des HI-Virus

Quelle: National Institutes for Biological Standards and Control,
Großbritannien;

http://www7.nationalacademies.org/german-beyonddiscovery/Proteasen_5.html)

2.3 Replikationszyklus

Die Zielzellen von HIV sind Zellpopulationen, die an ihrer Oberfläche den CD4-Rezeptor exprimieren. Diese CD4⁺-Zellen sind Schlüsselzellen des menschlichen Organismus, insbesondere in den wichtigen Funktionsbereichen Immunsystem und Zentrales Nervensystem. Durch Befall der CD4⁺-Lymphozyten zerstört HIV das körpereigene Abwehrsystem; durch Befall von Nervenzellen treten neurologische Störungen unterschiedlicher Grade auf. Eine hohe CD4-Affinität besitzt das Hüllprotein gp120. Nach der Adsorption kommt es durch das Verschmelzen der HIV-Membran mit der Wirtsmembran zum Eindringen von HIV in die Zielzelle (Abbildung 3). Neben dem CD4-Rezeptor sind hierfür noch weitere Chemokin-Rezeptoren, wie z. B. CCR-5 und/oder CXCR-4, von Bedeutung. Mit dem Verlust der viralen Hülle (uncoating) werden die virale RNA, *gag*-Gen-Proteine sowie die *pol*-Gen-Enzyme in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Mit Hilfe der RT wird nun die einzelsträngige virale RNA in provirale DNA transkribiert. Anschließend wird in mehreren Einzelschritten eine doppelsträngige DNA-Kopie hergestellt, die mit Hilfe der INT als kovalent gebundene provirale DNA in das Wirtsgenom integriert wird. Dies hat die permanente Infektion dieser Zelle mit dem HI-Virus zur Folge.

HIV macht sich zur Neuproduktion viraler Partikel die Replikationsprozesse der Wirtszelle zu Nutze, wobei hierbei vorerst noch nicht infektiöse Vorläuferproteine entstehen. Diese Vorläuferproteine werden, mit Ausnahme der *env*, die durch zelluläre Protease gespalten wird, während der Virusreifung mit Hilfe der PR in funktionsfähige Strukturproteine gespalten. Anschließend erfolgt der Zusammenbau der einzelnen Viruskomponenten und das Freisetzen neuer infektiöser Viruspartikel aus der Wirtszelle mittels Ausknospung (*Ruf et al., 1996; Flemming et al., 1999*).

Grundvoraussetzung für die Entstehung von Mutationen bei HIV ist die enorm hohe

Fehlerrate beim Replizieren; da die RTs der Retroviren keinen Proofreading-Mechanismus besitzen, kommt es nicht zur Überprüfung und Korrektur von Fehlern durch die Polymerase, etwa jede 10.000 Base wird falsch eingebaut, bei einer Virusreplikation, die in symptomatischen Patienten bei etwa 10^8 am Tag liegt.

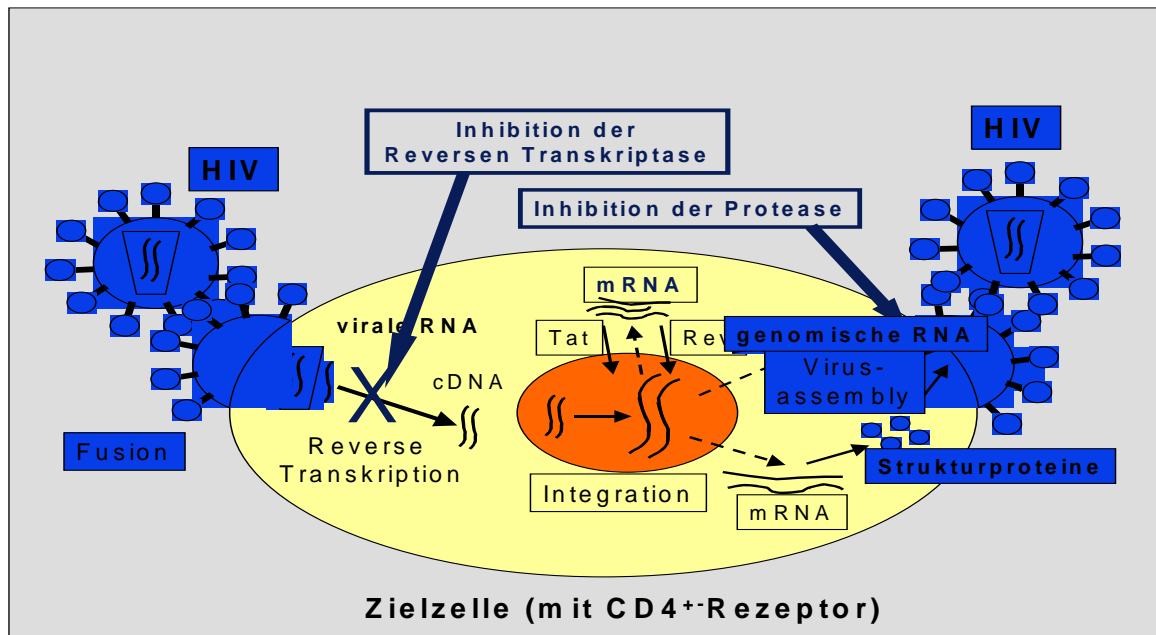


Abb. 3: Replikationszyklus von HIV

2.4 Epidemiologie

Nach Schätzung der AIDS-Organisation der Vereinten Nationen leben derzeit 39,5 Millionen Menschen weltweit mit HIV. Allein in 2006 kam es zu 4,3 Millionen Neuinfektionen. Rund 2,9 Millionen Menschen starben weltweit allein im Jahre 2006 an den Folgen von AIDS. Bisher erlagen insgesamt weit über 30 Millionen Menschen der Immunschwäche (Stand Ende 2006).

Abb. 4 zeigt sehr deutlich, dass es sich bei HIV um eine Epidemie handelt, von der die gesamte Weltbevölkerung betroffen ist. 95 Prozent der HIV-Infizierten leben allerdings in Entwicklungsländern, mehr als zwei Drittel davon in Afrika mit Schwerpunkt südlich der Sahara.

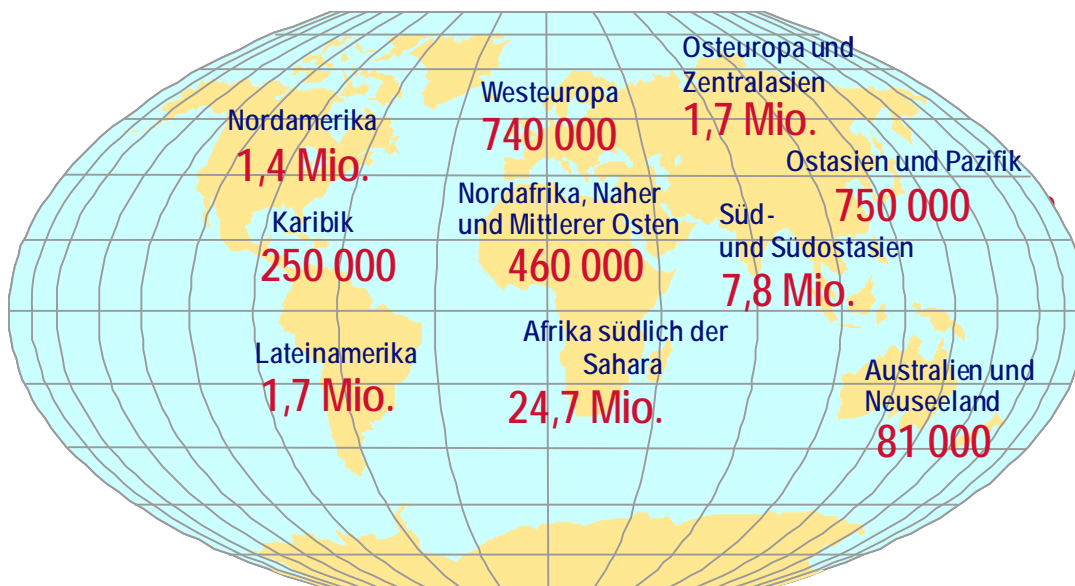


Abb. 4: Verteilung der HIV-Infektion weltweit Ende 2006 nach Schätzung der WHO
(Quelle: <http://www.unaids.org>)

Tabelle 1 zeigt die HIV-Situation in Deutschland im Jahr 2006.

Situation in Deutschland – Ende 2006	
Kinder und Erwachsene	
Menschen, die Ende 2006 mit HIV/AIDS lebten	56.000
HIV-Neuinfektionen im Jahr 2006	2.700
Neue AIDS-Erkrankungen im Jahr 2006	1.200
Gesamtzahl der HIV-Infizierten seit Beginn der Epidemie	82.000
Gesamtzahl der AIDS-Erkrankungen seit Beginn der Epidemie	32.500
Todesfälle aufgrund von HIV/AIDS im Jahr 2006	600
Gesamtzahl des Todesfälle aufgrund von HIV/AIDS seit Beginn der Epidemie	26.000

Tab. 1: Infektionssituation in Deutschland Ende 2006
(Quelle: Robert-Koch-Institut; www.rki.de)

2.5 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Bei der HIV-Infektion handelt es sich um eine chronische Erkrankung, die in verschiedene Phasen eingeteilt werden kann (Abbildung 5).

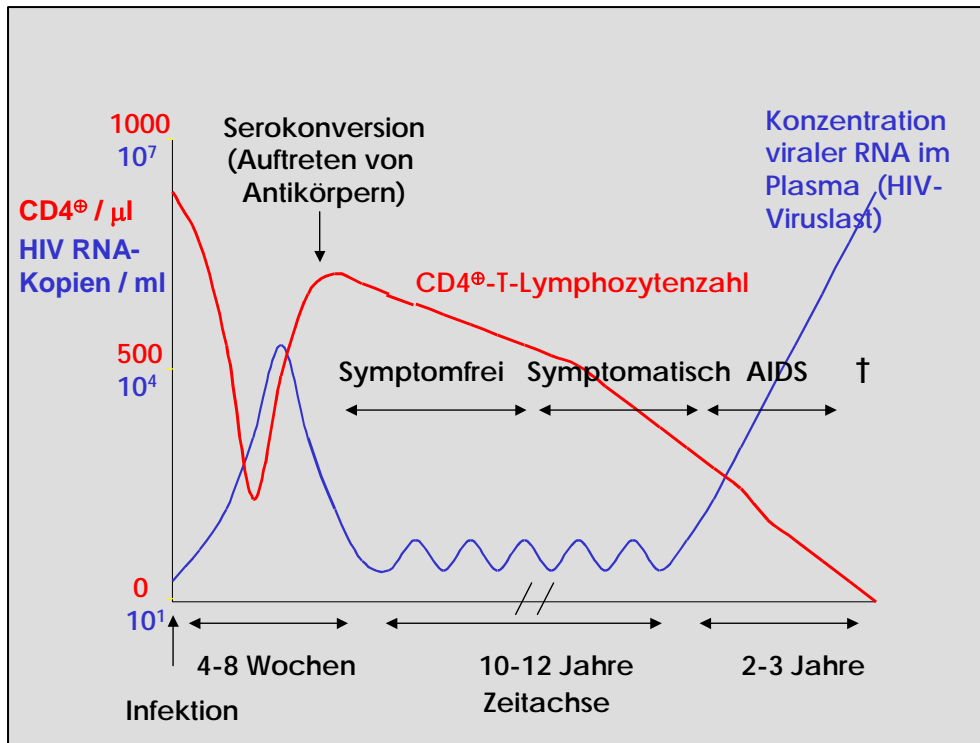


Abb. 5: Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

(Quelle: Preiser, Rabenau, Doerr: Viren-, Viruserkrankungen, Zett-Verlag, 2002)

Während der ersten Phase (Akutes HIV-Syndrom) kommt es initial zu einem enormen Anstieg der Viruslast (Genomkopien pro ml Blut, VL). Bei den Infizierten ist diese Phase häufig durch ein grippeähnliches Krankheitsgefühl gekennzeichnet, verbunden mit Fieber, Kopfschmerzen, Pharyngitis, Laryngitis, polymorphes Exanthem, Diarrhoe sowie einer generalisierten Lymphadenopathie. Das Auftreten der klinischen Symptomatik markiert den Zeitpunkt der initialen HI-Virämie und der Verteilung von HIV in andere Organe, insbesondere in das lymphatische System. Ab diesem Zeitpunkt ist ein direkter Erregernachweis mittels PCR möglich (ca. 14

Tage nach Infektion).

Da bei der HIV-Infektion die Keimzahl für die Infektiosität eine große Rolle spielt, ist gerade in dieser Zeit die Ansteckungsgefahr für andere besonders hoch. 3–6 Wochen nach der Primärinfektion kommt es zu einem starken Abfall der CD4⁺-Zellen. Zwar steigt die Anzahl der CD4⁺-Zellen nach einigen Wochen bis Monaten wieder an, sie erreicht aber in der Regel nicht mehr die Ausgangswerte von vor der Infektion, die bei einem immunkompetenten Erwachsenen bei etwa 900 (+/- 300) CD4⁺-Zellen pro μ l Blut liegen. Die Antikörperbildung lässt sich nach ca. 22 Tagen nachweisen, mit den modernen Tests der vierten Generation (gekoppelter Antikörper- und Antigen-Nachweis) gelingt ein positiver Nachweis schon nach ca. 18 Tagen.

Während der Phase der klinischen Latenz ist der Infizierte weitgehend asymptomatisch. Diese Phase dauert ohne antiretrovirale Behandlung durchschnittlich etwa zehn Jahre. Die VL bewegt sich meist auf einem niedrigen, für jeden Patienten individuellen Niveau, verglichen mit der Initialphase. Diese Werte dürfen jedoch nicht darüber hinweg täuschen, dass die Viren in den Lymphknoten persistieren. Das Lymphgewebe stellt ein Erregerreservoir dar, in dem auch in der Periode der klinischen Latenz fortwährend eine starke Virusvermehrung stattfindet (*Pantaleo et al., 1993*). Im Laufe der Jahre kommt es dann zu einem kontinuierlichen Abfall der CD4⁺-Zellzahl als Zeichen des sich entwickelnden Immundefektes (*Bagnarelli et al., 1992*).

CD8⁺-T-Lymphozyten nehmen in der Latenzphase der HIV-Infektion eine Schlüsselrolle in der Immunreaktion ein, indem sie für die Elimination der infizierten Zellen und somit für die Kontrolle der VL verantwortlich sind. Viren-Neuproduktion und Elimination halten sich während dieser Phase die Waage (*Liu et al, 1998*).

Die dritte Phase der HIV-Infektion beschreibt die Phase der AIDS-assoziierten Symptome (ARC, Abkürzung für engl. AIDS-related complex). ARC ist definiert als das Vorliegen von Symptomen, ohne dass eine AIDS-definierende Erkrankung vor-

liegt, wie beispielsweise Lues maligna, Mundsoor, Ösophagitissoor, Herpes zoster, Leukoplakien am Zungenrand, Dellwarzen (Mollusken). In dieser Phase kann das Immunsystem das Gleichgewicht zwischen Neuproduktion der CD4⁺-Helferzellen sowie deren Verlust nicht mehr halten. Die andauernde Vermehrung der Viren kann nicht mehr kontrolliert werden; es kommt zu einem deutlichen Ansteigen der VL und zu einem verstärkten Abfall der CD4⁺-Helferzellen. Dies stellt meist den Übergang von der symptomfreien Phase zum symptomatischen Erkrankungsstadium dar.

Die letzte Phase – AIDS – ist gekennzeichnet durch opportunistische Erkrankungen. Zu diesen gehören u. a. Pneumocystis carinii-Pneumonien (PCP), Karposi-Sarkome, bakterielle Pneumonien u. v. m. Werte unter 200 CD4⁺-Zellen pro μl im peripheren Blut in Verbindung mit opportunistischen Infektionen, neoplastischen Erkrankungen, HIV-Enzephalopathie, Gewichtsverlust (Wasting-Syndrom) und/oder progressiver multifokaler Leukenzephalopathie als Komplikationen des klinischen Verlaufs, definieren das Vollbild AIDS. Das Stadium von AIDS führt unbehandelt in kürzester Zeit zum Tod.

Die nachfolgende CDC-Klassifikation des Centers of Disease Control teilt den Verlauf der HIV-Erkrankung in drei klinische Kategorien ein, die direkt mit der Anzahl der CD4⁺-Zellen verknüpft werden (Tabelle 2).

Laborkategorie CD4-Zellen pro μl Blut	Klinische Kategorie		
	A (asymptomatisch)	B (symptomatische HIV-Infektion, kein AIDS)	C (AIDS)
≥ 500	A1	B1	C1
200 – 499	A2	B2	C2
< 200	A3	B3	C3

Tab. 2: Stadieneinteilung der HIV-Infektion nach CDC-Klassifikation (Center for Disease Control, 1993)

Diese Klassifikation dient der groben Orientierung über das erreichte Krankheitsstadium einer HIV-Infektion und findet bis heute Verwendung. Allerdings gab es 1993, als diese Klassifikation verabschiedet wurde, noch nicht die heute angewandten Behandlungsmöglichkeiten, so dass die CDC-Klassifikation keinerlei Verbesserung des Krankheitszustandes berücksichtigt, sondern von einer kontinuierlichen Verschlechterung ausgeht.

2.6 Übertragung von HIV

Als Hauptübertragungswege sind bekannt:

- ungeschützter Geschlechtsverkehr (Analverkehr, vaginaler Verkehr, orogenitale Kontakte)
- Einbringung von erregerehaltigem Blut oder Blutprodukten in die Blutbahn (Gebrauch von Spritzbestecken durch mehrere Personen bei i. v.-Drogenabhängigen, Transfusion von kontaminierten Blutkonserven oder Gerinnungspräparaten, Nadelstichverletzungen)
- prä-, peri- oder postnatal (durch Stillen) von der infizierten Mutter auf ihr Kind

Blut, Samenflüssigkeit und Vaginalsekret weisen bei HIV-Infizierten in der Regel die

höchsten Viruskonzentrationen auf. Jeder Infizierte ist lebenslang infiziert und bleibt auch lebenslang potenziell ansteckungsfähig. Jedoch ist die Infektiosität abhängig von der jeweiligen Virusbelastung.

2.7 Therapie der HIV-Infektion

Die Therapieempfehlungen für den Einsatz antiretroviraler Medikamente sind einem kontinuierlichen Wandel unterzogen. Vor einigen Jahren galt noch die Richtlinie: „*Hit hard and early!*“ mit dem Ziel, frühestmöglich die Virusbelastung zu senken (Ho, 1995). Die vergangenen Jahre haben jedoch gezeigt, dass ein früher Therapiebeginn mit einer Reihe von Nebenwirkungen und Toxizitäten verknüpft ist. Aufgrund dieser Toxizitäten sowie der Resistenzbildungen kann derzeit die Wirksamkeit einer Therapie noch nicht zeitlich unbegrenzt aufrechterhalten werden (www.hiv.net; Blankson, 2005).

Auf dem Welt-AIDS-Kongress 2002 in Barcelona wurde eine neue Therapieempfehlung herausgegeben, nach der der Beginn einer antiretroviralen Therapie (ART) so lange wie möglich hinausgezögert werden sollte. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Therapiebeginn auch in einem bereits weit fortgeschrittenen Stadium der HIV-Infektion nach wie vor zu einer deutlichen klinischen Besserung mit Wiederherstellung des Immunsystems führen kann. Derzeit empfohlen ist ein Therapiebeginn bei asymptomatischen Patienten bei Absinken der CD4⁺-Zellzahl auf unter 350 pro µl Blut, wobei die Grenze von 200 nicht unterschritten werden sollte. Bei symptomatischen Patienten sollte unabhängig von der CD4⁺-Zellzahl eine sofortige antiretrovirale Therapie begonnen werden (Hammer et al., 2006).

Das heute gängige Therapieschema ist die sog. HAART-Therapie (engl. Highly Active Antiretroviral Itherapy). Hierunter versteht man die Behandlung mit einer mindestens Dreifach-Medikamenten-Kombination. Üblicherweise werden zwei Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) mit entweder einem Protease Inhibitor (PI), einem Nicht-Nukleosidalen Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI) oder einem weiteren NRTI kombiniert. Ziel hierbei ist es, die Virusbelastung

unter die Nachweisgrenze zu bringen. Diese liegt je nach Labor und Test bei 20-50 Kopien pro ml Blut.

Jede Therapie sollte durch ein Monitoring überwacht werden. Als Parameter dienen hierzu die VL sowie die CD4⁺-Lymphozytenanzahl. Ein Therapieversagen zeigt sich in einem Anstieg der VL um eine oder mehrere log₁₀-Stufen bzw. in einem signifikanten Abfall der CD4⁺-Zellzahl. Allerdings stellt eine Veränderung dieser Parameter nicht unbedingt ein Medikamentenversagen dar (*Young et al, 1998*). Die Ursachen für ein Therapieversagen sind vielfältig. Hierzu gehören unregelmäßige Medikamenten-Einnahme durch mangelnde Compliance des Patienten, unzureichende Wirkstoffspiegel durch individuelle Variabilität in der Resorption und Metabolisierung sowie Wechselwirkungen der Medikamente untereinander. Die dadurch stattfindende Virusreplikation unter medikamentöser Therapie führt unweigerlich zur Resistenzentwicklung. Eine Verbesserung dieser Situation kann durch eine Therapie mit geboosterten PIs erreicht werden, wie Studien (*Gathe et al., 2004*) sowie der klinische Alltag zeigen.

2.7.1 Antiretrovirale Medikamente

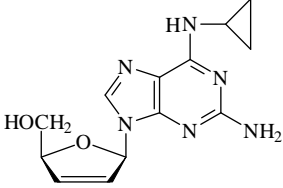
Als antiretrovirale Medikamente zur Behandlung von HIV stehen derzeit vier Wirkstoffklassen zur Verfügung. Die in den achtziger Jahren als erste eingeführte Klasse ist die Gruppe der Reversen Transkriptase Inhibitoren (RTIs). Diese wird wiederum unterteilt in Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) und Nicht-Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs). Die Protease Inhibitoren (PIs) stellen eine weitere Wirkstoffklasse dar. Mit den Fusionshemmern (FIs) ist seit März 2003 eine weitere Medikamentengeneration auf dem Markt.

2.7.1.1 Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs)

NRTIs sind chemisch leicht veränderte Nukleosid-Bausteine. Diese werden anstelle der natürlichen Nukleotide als „falsche“ Bausteine in die DNA-Kette eingebaut.

Durch das Fehlen der 3'OH-Gruppe kann an dieser Position der DNA-Strang nicht mehr verlängert werden; es kommt zum Kettenabbruch und somit zur Blockierung der RT.

Ein Beispiel aus dieser Medikamentenklasse ist das Abacavir:

Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:	Abacavir Ziagen 17.12.1998 Glaxo Wellcome	 Abacavir (ABC)
--	---	---

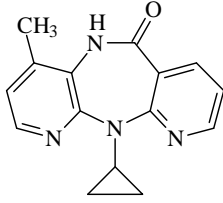
Tab. 3: Strukturformel von Abacavir

NRTI-Triphosphate sind nicht nur in der Lage, ihr eigentliches Zielmolekül zu hemmen, sondern interagieren unter Umständen auch mit der humanen γ -Polymerase, die für die Bildung der mitochondrialen DNA (mtDNA) essentiell ist. Die Inhibition der γ -Polymerase führt zu einer Hemmung der Atmungskette mit nachfolgender Störung verschiedener Stoffwechselfunktionen. Als Nebenwirkungen von NRTIs sind zu nennen: Gastrointestinale Beschwerden, anaphylaktischer Schock, Neuropathien, Myopathien, Lipoatrophie, Pankreatitis, Schlafstörungen, Müdigkeit, Kopfschmerzen sowie die Mitochondriale Toxizität.

2.7.1.2 Nicht-Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs)

NNRTIs hemmen ebenso wie die NRTIs die RT, unterscheiden sich aber grundlegend in ihrer Struktur. Sie passen genau in die Nukleosid-binding-pocket, der Bindungstasche neben dem aktiven Zentrum der RT, und führen zu einer allosterischen Veränderung am Enzym und somit zu dessen Hemmung.

Viramune ist ein Vertreter dieser Klasse:

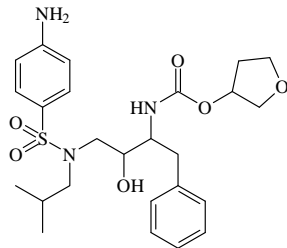
<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Nevirapin Viramune 21.06.1996 Boehringer Ingelheim</p>	 <p>Nevirapine (NVP)</p>
--	--	---

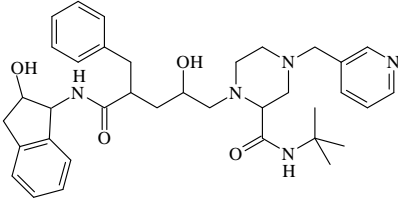
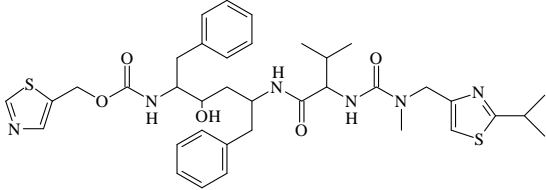
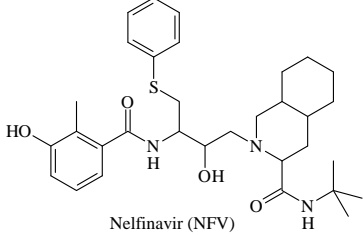
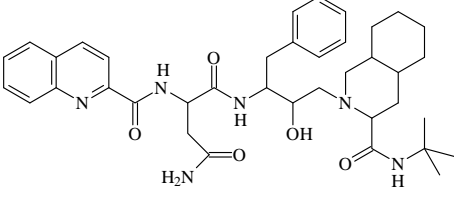
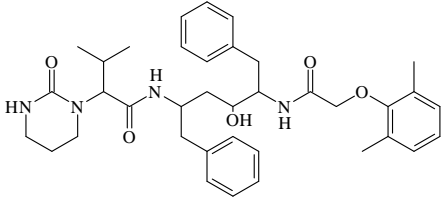
Tab. 4: Strukturformel von Viramune

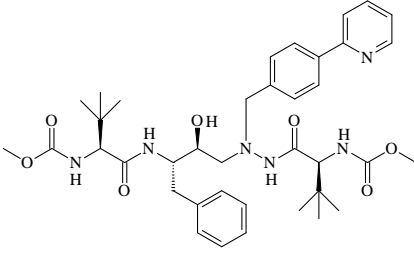
Zu den Nebenwirkungen der NNRTIs gehören: Gastrointestinale Beschwerden, Exantheme, Fieber, Transaminasen-Anstieg, Benommenheit, Schlafstörungen, Alp-träume.

2.7.1.3 Protease Inhibitoren (PIs)

PIs sind Substanzen, die das aktive Zentrum der PR blockieren und somit das Enzym hemmen. In dieser Gruppe sind folgende Medikamente zugelassen (Stand 2004):

<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Amprenavir Agenerase 15.04.1999 Glaxo Wellcome (mittlerweile Glaxo SmithKline)</p>	 <p>Amprenavir (APV)</p>
--	--	--

<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Indinavir Crixivan 13.03.1996 MSD Sharp & Dohme</p>	 <p>Indinavir (IDV)</p>
<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Ritonavir Norvir 01.03.1996 Abbott</p>	 <p>Ritonavir (RTV)</p>
<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Nelfinavir Viracept 14.03.1997 Hoffmann-La Roche</p>	 <p>Nelfinavir (NFV)</p>
<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Saquinavir Invirase; Fortovase 06.12.1995; 07.11.1997 Hoffmann-La Roche</p>	 <p>Saquinavir (SQV)</p>
<p>Wirkstoff: Handelsname: Ersteinführung: Hersteller:</p>	<p>Lopinavir + Ritonavir Kaletra 15.09.2000 Abbott</p>	 <p>Lopinavir (LPV)</p>

<p>Wirkstoff:</p> <p>Handelsname:</p> <p>Ersteinführung:</p> <p>Hersteller:</p>	<p>Atazanavir</p> <p>Reyataz</p> <p>Juni 2003</p> <p>Bristol-Myers Squibb</p>	 <p>Atazanavir (ATV)</p>
---	--	--

Tab. 5: Strukturformeln der klinisch zugelassenen PIs (Stand 2004)

In der Zwischenzeit sind noch weitere PIs zugelassen worden, die jedoch nicht Thema dieser Arbeit sind. Hierbei handelt es sich um folgende Medikamente:

Fosamprenavir (Lexiva® von Glaxo SmithKline): ersetzt als Calcium-Phosphatester Amprenavir.

Tipranavir (Aptivus® von Boehringer Ingelheim): Ende 2005 zur Kombinationstherapie zugelassen.

Darunavir (Prezista® von Janssen-Cileg): Die Zulassung erfolgte 2006.

Ritonavir: Aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen in der therapeutischen Dosis wird Ritonavir mittlerweile nur noch als Booster in entsprechend niedrigeren Dosierungen eingesetzt.

Folgende Nebenwirkung werden derzeit den PIs zugeteilt:

- metabolische Störungen, wie Hyperglykämie, Fettstoffwechselstörungen
- Lipodystrophie: Diese Fettumverteilungsstörung nimmt mit steigender Therapiedauer zu und stellt für den betroffenen Patienten vor allem auch ein kosmetisches Problem dar.
- gastrointestinale Unverträglichkeit mit Übelkeit, Erbrechen, Durchfall

- Nierensteinbildung
- Kopfschmerzen
- orale Parästhesien
- Transaminasen- und Bilirubinanstieg
- Exantheme
- Geschmacksveränderungen

2.7.1.4 Fusionsinhibitoren (FI)

Medikamente dieser neuen Substanzgruppe verhindern das Eindringen bzw. Verschmelzen von HIV mit der Wirtszelle durch Blockierung einer Konformationsänderung des Virus-Hüllproteins gp41. Als erster Wirkstoff in dieser Substanzklasse wurde Enfuvirtide (Fuzeon) von dem Hersteller Trimeris/Roche am 13.03.2003 zugelassen.

2.8 Aufbau und Funktion der Protease

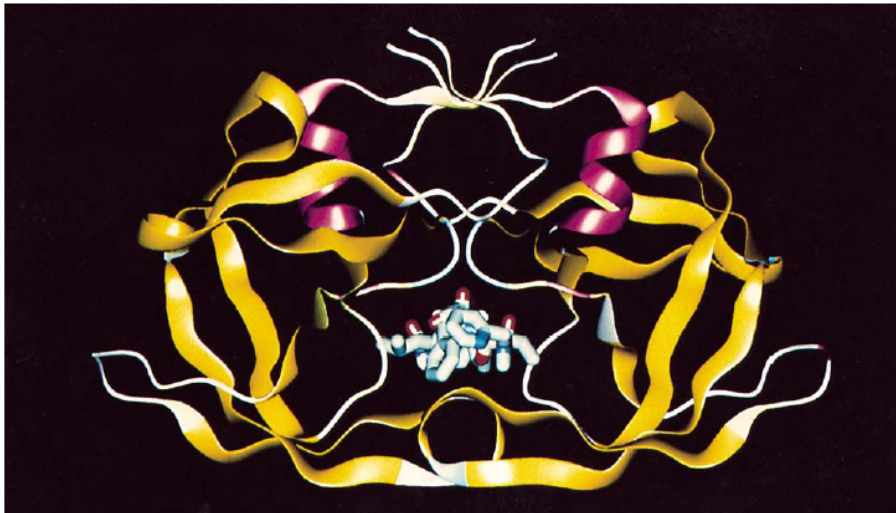


Abb. 6: Struktur der HIV-1 PR
(Quelle: Flexner C: HIV-Protease Inhibitors; New Engl. J Med. 1998)

Bei der PR handelt es sich um ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten, die aus jeweils 99 Aminosäuren (AS) bestehen. Das aktive Zentrum befindet sich im Bereich der Symmetrieachse und stellt die Substratbindungsstelle dar. Als natürliche Substrate dienen die Vorläuferproteine, bis auf gp160, welches von zellulären Proteasen gespalten wird. Nach Bindung im aktiven Zentrum erfolgt jeweils eine enzymatische Spaltung zwischen Phenylalanin und Prolin. Dies führt zur Bildung von funktionsfähigen Struktur-Proteinen (*Flexner 1998*).

PIs machen sich diesen Mechanismus zu Nutze, indem sie die natürliche Spaltstelle (Phenylalanin – Prolin) imitieren. Sie werden so als Substrat erkannt und können im aktiven Zentrum binden. Allerdings sind die Seitenketten der Medikamente so modifiziert, daß sie nach der Spaltung nicht wieder freigesetzt werden können und führen somit zu einer irreversiblen Blockierung des Enzyms.

2.9 Entstehung von Mutationen und Resistenzentwicklung

Die Auswirkungen von Mutationen sind vielfältig. So gibt es stumme Mutationen an sog. „Wobble“-Positionen, welche nicht zu einem AS-Austausch führen. Andere Mutationen sind neutral, d. h. der AS-Austausch hat keine Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit des Enzyms. Mutationen, die zur Entstehung von vermehrungsunfähigen Viren führen, sind für den Patienten als vorteilhaft zu werten. Desweiteren gibt es Resistenzmutationen, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den antiretroviralen Substanzen zeigen, aber gleichzeitig zu einer Verminderung der viralen Fitness führen (*Devereux et al., 2001*). Die virale Fitness beschreibt die Fähigkeit der Viren in einer gegebenen Umgebung zu replizieren (*Nijhuis et al., 2001*). Kompensatorischen Mutationen sind zusätzliche Mutationen, die durch Konformationsänderung des Enzyms zu einer Verbesserung oder Wiederherstellung der viralen Fitness führen und somit das Replikationspotential verstärken können (*Martinez-Picado et al., 1999; Piana et al., 2002; Nijhuis et al., 1999; Miller 2001*).

Resistenzmutationen haben beim nicht therapierten Patienten für die Viruspopulation keinen Selektionsvorteil, da sie sich meist ungünstig auf die „virale Fitness“ auswirken. Daher besteht die Viruspopulation beim nicht therapierten Patienten fast ausschließlich aus dem medikamenten-sensitiven Wildtyp.

Jeder Einsatz von antiretroviralen Medikamenten setzt HIV unter einen vermehrten Selektionsdruck. Kann die Therapie die Virusreplikation nicht vollständig unterdrücken, kommt es zur Selektion von Mutanten, die eine Medikamenten-Resistenz aufweisen. Resistenz gegen antiretrovirale Medikamente wird durch Mutationen in den codierenden Sequenzen für die entsprechenden HIV-Enzyme verursacht. Man unterscheidet Primär-, Sekundär- und kompensatorische Mutationen. Bei der PR befinden sich die Primärmutationen fast ausschließlich im Bereich des aktiven Zentrums (*Muzammil et al., 2003*). Mutationen auf diesen Positionen führen zur sofortigen, vollständigen Resistenz gegen das jeweilige Medikament oder können im Rahmen einer Kreuzresistenz auch Resistenzen gegen andere Medikamente bewirken. Im Unterschied zu den Primärmutationen verursachen Sekundärmutationen bei alleinigem Auftreten noch keine Resistenz. Sie können aber die durch Primärmutationen bedingte Resistenz verstärken oder bei Vorhandensein mehrerer Sekundärmutationen zu einer Resistenz bzw. Kreuzresistenz führen. Sekundär- und kompensatorische Mutationen finden sich bei der PR im äußeren Bereich des Enzyms.

2.9.1 Resistenzen der Protease

Tabelle 6 zeigt die für die jeweiligen Medikamente derzeit bekannten Mutationen, die mit Resistenzen belegt sind. Die farblich unterlegten Zahlenreihen entsprechen der jeweiligen Position der AS in der PR. Die darüber befindliche Zeile zeigt die jeweilige AS, die an dieser Position beim Wildtyp zu finden ist, dargestellt im One-Letter-Code. In den Zeilen darunter sind die für eine Resistenzentwicklung relevanten AS aufgeführt. Die „fettgedruckten“ AS-Positionen stellen Primärmutationen dar. Alle anderen entsprechen Sekundärmutationen.

Indinavir	L	K	L	V	M	M				I	A	G	V	V	I	L		
	10	20	24	32	36	46				54	71	73	77	82	84	90		
	I	M	I	I	I	I				V	V	S	I	A	V	M		
	R	R				L					T	A		F				
	V													T				
Ritonavir	L	K		V	L	M				I	A		V	V	I	L		
	10	20		32	33	46				54	71		77	82	84	90		
	F	M		I	F	I				V	V		I	A	V	M		
	I	R				L				L	T			F				
	R													T				
	V													S				
Saquinavir	L								G	I	A	G	V	V	I	L		
	10								48	54	71	73	77	82	84	90		
	I								V	V	V	S	I	A	V	M		
	R								L		T							
	V																	
Nelfinavir	L			D		M	M						A	V	V	I	N	L
	10			30		36	46						71	77	82	84	88	90
	F			N		I	I						V	I	A	V	D	M
	I					L							T		F		S	
															T			
															S			
Amprenavir	L			V		M	I	I	I				G		I	L		
	10			32		46	47	50	54				73		84	90		
	F			I		I	V	V	L				S		V	M		
	I					L			V									
	R								M									
	V																	
Lopinavir / Ritonavir	L	K	L	V	L	M	I	I	F	I	L	A	G	V	I	L		
	10	20	24	32	33	46	47	50	53	54	63	71	73	82	84	90		
	F	M	I	I	F	I	V	V	L	V	P	V	S	A	V	M		
	I	R				L				L		T		F				
	R													T				
	V													S				

Tab. 6: Darstellung der Primär- und Sekundärmutationen für die PIs

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Prävalenz und der Auswertung von Punktmutationen, die bei der viruseigenen PR von HIV-1 zu finden sind. Ziel war darüber hinaus, Zusammenhänge zwischen spezifischen Mutationen und Resistenzentwicklungen darzustellen sowie Korrelationen zu klinischen Parametern zu diskutieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasst 688 Proben von HIV-Patienten, die im Zeitraum vom 15.02.1996 bis zum 29.10.2001 im Institut für Medizinische Virologie der Universität Frankfurt aufgrund von Therapieversagen bzw. in der Therapiepause vor Wiederbeginn einer ART genotypisiert wurden.

Die 688 Patientenproben verteilen sich wie folgt auf die einzelnen Jahre:

1996:	8 Patientenproben
1997:	8 Patientenproben
1998:	5 Patientenproben
1999:	35 Patientenproben
2000:	227 Patientenproben
2001:	405 Patientenproben

Tab. 7: Zeitliche Verteilung der Patientenproben

3.2 Genotypisierung

Die Genotypisierungen wurden im Virologischen Labor der Uniklinik Frankfurt mit dem ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 (Abbott, Wiesbaden) nach Herstelleranleitung, modifiziert nach Stürmer et al., J. Med. Virol. 2003, wie folgt durchgeführt:

- 1 ml EDTA-Blutplasma wird 60 min bei 25000 x g zentrifugiert, um Viruspartikel zu konzentrieren
- 860 µl Überstand werden verworfen

- Aus den verbleibenden 140 µl wird nun die RNA extrahiert. Die Extraktion erfolgt mittels QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisung mit kleiner Modifikation.
- Hinzugabe von 560 µl AVL-Puffer
- Mischen
- 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 560 µl Ethanol absolut hinzugeben
- Vortexen
- Erste Hälfte der Lösung auf die Säule geben. Anschließend 1 Minute bei 6000 U/min. zentrifugieren; Eluat verwerfen
- Zweite Hälfte der Lösung auf die Säule geben. Anschließend 1 Minute bei 6000 U/min. zentrifugieren; Eluat verwerfen
- 500 µl Waschpuffer (AW1) auf jede Säule geben zur Reinigung der RNA
- 1 Minute zentrifugieren; Eluat verwerfen
- 500 µl Waschpuffer (AW2) hinzugeben
- 2 Minuten zentrifugieren bei höchster Geschwindigkeit, um restliches Ethanol aus den Säulen herauszuwaschen; Eluat verwerfen
- nochmals 1 Minute zentrifugieren; Eluat verwerfen
- 50 µl Elutionspuffer hinzugeben
- 3 – 4 min. bei 6000 U/min. zentrifugieren
- Die folgenden Reaktionsschritte werden mit dem ViroSeq-System durchgeführt
- Reverse Transkription: Die gereinigte RNA wird mit Hilfe einer Moloney Murine Leukemia Virus-RT und einem spezifischen HIV-Primer in DNA transkribiert. Hierzu werden 10 µl RT-Mastermix zu 10 µl RNA hinzugegeben. Als Produkt erhält man HIV-cDNA.

- cDNA-Produkt:
Zugabe von 30 µl PCR-Mastermix
40 Zyklen PCR mit AmpliTaqGold
PCR ergibt 1,8 kb DNA-Produkt
PCR Amplifikation wird durchgeführt mit Uracil-N-Glykosylase-Kontaminations-Kontrollsystem, um das Risiko einer Kontamination zu verringern.
- Aufreinigung der amplifizierten DNA durch Filterung mittels Spin-Columns: Hierbei erfolgt die Abtrennung von nicht eingebauten Primern und Nukleotiden durch Filtration.
- Anschließend erfolgt die Auftrennung der DNA durch eine Agarosegel-Elektrophorese. Die Gelelektrophorese dient der Quantifizierung der Amplifikationsprodukte. Hierzu werden die gereinigten DNA-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen, welches das DNA-interkalierende und fluoreszierende Agens Ethidiumbromid enthält. Durch Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA kann unter UV-Licht aufgrund der Lichtemission auf die Menge der vorliegenden DNA-Fragmente geschlossen werden. Dies dient der Überprüfung, ob das PCR-Produkt zum Sequenzieren in ausreichender Menge vorliegt.
- Die DNA wird nun in sechs Proben aufgeteilt und jeweils ein spezifischer Primer/Sequenziermix hinzugegeben (A, B, C, F, G, H). Bei den Primern A - C handelt es sich um Forward-Primer; sie lesen den Sense-Strang in 5' – 3'-Richtung ab. F – H sind Reverse-Primer; sie lesen den Anti-sense-Strang in 5' – 3'-Richtung ab. Jeder Primer hybridisiert an einem anderen Genabschnitt (Abb. 7). Primer D dient als Reserveprimer für Primer A. Im Mix sind effloreszierende Terminatoren enthalten, die nach ihrem Einbau in die wachsende DNA-Kette zum Kettenabbruch führen (hier bitte Zitat von Sanger einführen). Das Produkt sind farbmarkierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge.

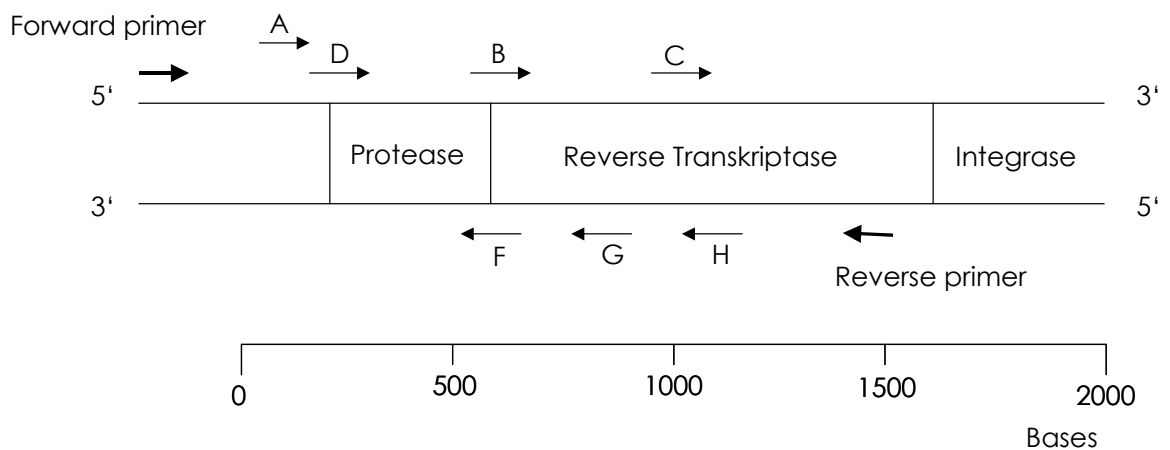


Abb. 7: Lage der PCR- und Sequenzierungsprimer im ViroSeq

- DyeEx 96 Kit (Qiagen): Abtrennung der nicht eingebauten Terminatoren und Primer mittels Gelfiltration
- ABI 377-96 Sequenzer: Gereinigte farbmarkierte DNA-Fragmente werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers entsprechend detektiert.
- Sequenzierungsdaten: Mit Hilfe des Sequenzanalyse-Systems wird die Basenabfolge der DNA-Produkte der sechs Primer dargestellt. Aus den sechs Teilsequenzen erstellt nun die HIV Genotyping System Software (Applied Biosystems) eine Konsensus-Sequenz. Sie umfaßt die Protease-AS 1-99 und die RT-AS 1-324. Anschließend erfolgt die Übersetzung der Basenabfolge in eine AS-Sequenz, die mit den Wildtyp-Daten verglichen wird.
- Das Ergebnis ist ein HIV-Genotypisierungsbericht.

3.3 Datenbank

Als Analysegrundlage wurde zu Beginn aus den vorhandenen Daten der Genotypisierungen eine Excel-Datenbank erstellt.

Bei den für die PIs relevanten AS-Positionen handelt es sich zum einen um die nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft mit Primärresistenz verbundenen Positionen 30, 46, 48, 50, 82, 84 und 90, und zum anderen um die mit Sekundärmutationen assoziierten AS-Positionen 10, 16, 20, 24, 32, 33, 36, 47, 54, 60, 63, 69, 71, 73, 77 und 88.

3.4 Jahresauswertungen

Da in den Jahren 1996 bis 1999 nur relativ wenige Patientenproben zur Auswertung zur Verfügung standen, wurden die Daten der Jahre 1996 + 1997 sowie 1998 + 1999 zusammengefaßt.

Bei der Betrachtung der Mutationen bezogen auf die einzelnen Jahre wurden für das Jahr 2001 nur Daten bis einschließlich 29.10.2001 berücksichtigt.

3.5 Spezifische Patientenauswertungen

Die Auswertung und Interpretation spezifischer Patienten erfolgte mit Hilfe der Monitoring-Daten aus der Infektionsambulanz. Relevant waren hierfür insbesondere die verschiedenen Laborparameter, wie VL und Anzahl der CD4⁺-Helferzellen, sowie die jeweiligen Therapien, die die Patienten im Rahmen ihrer ART-Behandlungen erhielten.

3.6 Low-Level-Auswertung

Als Low-Level-Patienten wurden Patienten definiert, die zum Zeitpunkt der Sequen-

zierung eine VL von <1000 Kopien pro ml Blut aufwiesen. Dieses Kriterium erfüllten 33 Patienten.

3.6.1 Patientenverläufe

Bei den beiden in dieser Arbeit beschriebenen Patienten handelt es sich um Patienten aus dem Low-Level-Kollektiv. Sie wurden aufgrund der Tatsache ausgewählt, dass hier sowohl Daten aus Sequenzierungen bei einer niedrigen VL von <1000 Kopien pro ml Blut als auch bei einer hohen VL vorlagen.

Die AS-Positionen sind bei allen Auswertungen im Einletter-Code dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Auswertung der Datenbank

Bei der Verteilung von Wildtypen und Mutationen auf den mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen, ergab sich folgendes Bild (Abbildung 8):

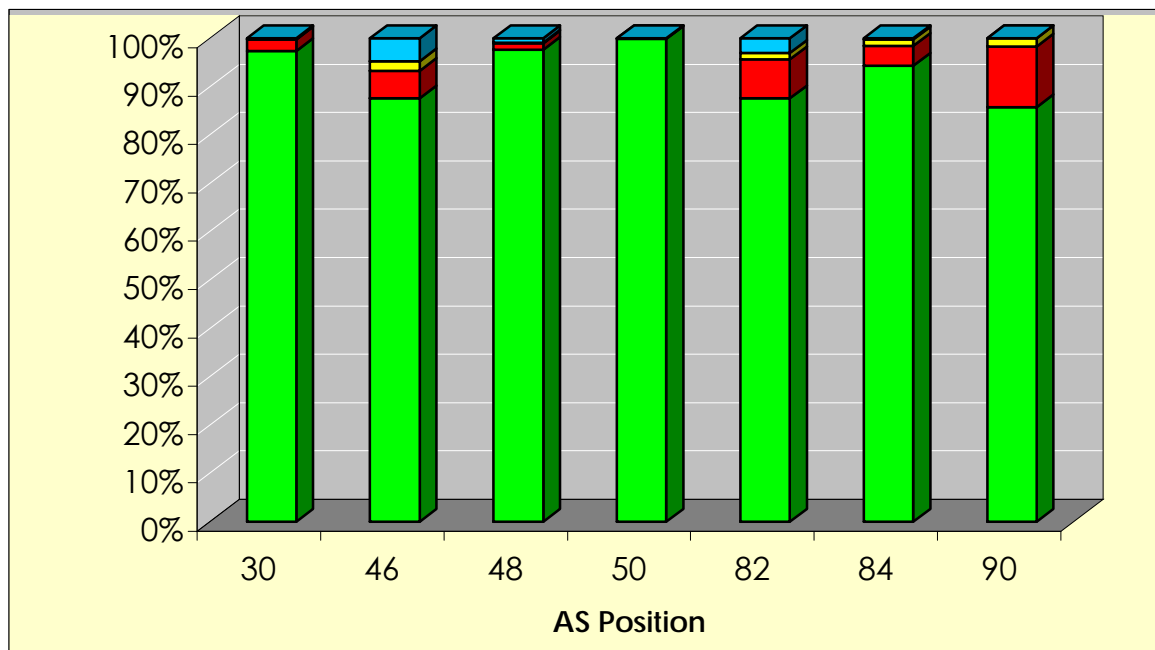


Abb. 8: Verteilung von Wildtyp und Mutationen auf mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen

grün: Wildtyp in %
rot: Mutationen in %
gelb: Mix in %
blau: andere in %

Unter „Mutationen in %“ sind alle die Mutationen dargestellt, die mit einer direkten Primärresistenz verbunden sind. „Mix in %“ beinhaltet die Mischungen aus Wildtyp und relevanten Mutationen. Alle anderen Mutationen und Mischungen, die nicht mit direkter Primärresistenz assoziiert sind, sind unter „andere“ zusammengefaßt.

Abbildung 9 zeigt eine Zusammenfassung der Verteilung von Wildtypen und Mutationen für alle AS-Positionen in der Datenbank, die als Sekundärmutationen charakterisiert worden sind. Alle Mischungen wurden hierbei den Mutationen zugeordnet.

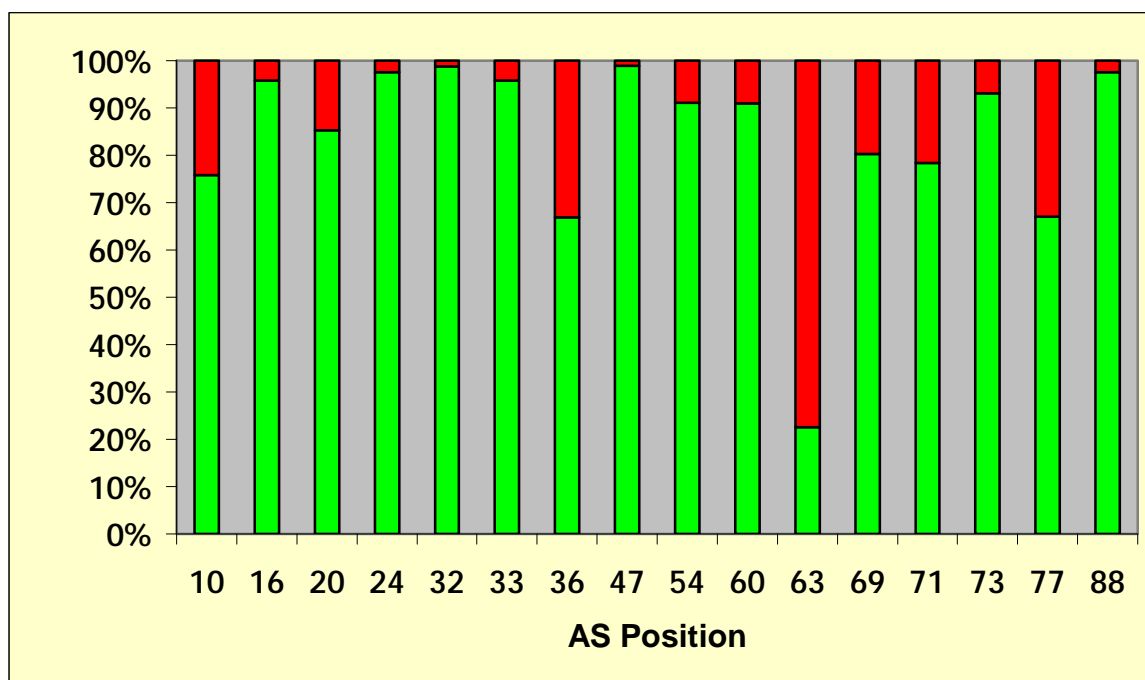


Abb. 9: Verteilung von Wildtyp und Mutationen bezogen auf die jeweilige AS-Position

grün: Wildtyp in %

rot: Mutationen in %

Bei der Prävalenz der Mutationen, sowohl bei den Primär- als auch bei den Sekundärmutationen, zeigt sich bei allen AS-Positionen ein deutliches Überwiegen des Wildtyps. Die alleinige Ausnahme bildet Position 63.

Die nachfolgende Tabelle stellt alle gefundenen Mutationen bezogen auf die betrachteten AS-Positionen dar und zeigt die Verteilung von Wildtypen und spezifischen Mutationen sowie Mischungen aus Wildtyp und Mutation in absoluten Zahlen und Prozenten.

4 ERGEBNISSE

Pos. AS	Wildtyp	N	%	Mut. AS 1	n	%	Mut. AS 2	N	%	Mut. AS 3	n	%	Mut. AS 4	n	%
10	L	522	75,87	I	113	16,42	R	1	0,15	V	18	2,62	F	4	0,58
16	G	659	95,78	E	19	2,76			0,00			0,00			0,00
20	K	587	85,32	M	6	0,87	R	25	3,63			0,00			0,00
24	L	671	97,53	I	13	1,89	V	0	0,00			0,00			0,00
30	D	670	97,38	N	16	2,33			0,00			0,00			0,00
32	V	680	98,84	I	5	0,73			0,00			0,00			0,00
33	L	659	95,78	F	9	1,31			0,00			0,00			0,00
36	M	460	66,86	I	185	26,89			0,00			0,00			0,00
46	M	602	87,50	I	40	5,81	L	26	3,78			0,00			0,00
47	I	681	98,98	V	4	0,58	A	0	0,00			0,00			0,00
48	G	672	97,67	V	9	1,31			0,00			0,00			0,00
50	I	687	99,85	V	0	0,00			0,00			0,00			0,00
54	I	627	91,13	M	2	0,29	V	42	6,10			0,00			0,00
60	D	626	90,99	E	55	7,99			0,00			0,00			0,00
63	L	155	22,53	P	380	55,23			0,00			0,00			0,00
69	H	552	80,23	Y	4	0,58			0,00			0,00			0,00
71	A	539	78,34	T	37	5,38	V	79	11,48			0,00			0,00
73	G	641	93,17	S	26	3,78			0,00			0,00			0,00
77	V	461	67,01	I	197	28,63			0,00			0,00			0,00
82	V	602	87,50	A	39	5,67	F	10	1,45	S	1	0,15	T	6	0,87
84	I	649	94,33	A	1	0,15	V	28	4,07			0,00			0,00
88	N	671	97,53	D	13	1,89	S	1	0,15			0,00			0,00
90	L	590	85,76	M	86	12,50			0,00			0,00			0,00

4 ERGEBNISSE

Pos. AS	Mut. Rest	n	%	Mix WT/rel.	n	%	Mix WT/Rest	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe n
10	Y	1	0,15	L/F; L/I; L/V; L/R/C/F	24	3,49		0	0,00		5	0,73	688
16	A	7	1,02	G/E	3	0,44		0	0,00		0	0,00	688
20	I; T; V	51	7,41	K/M; K/R	12	1,74	K/I;	4	0,58		3	0,44	688
24			0,00	L/I	3	0,44	L/F	1	0,15		0	0,00	688
30			0,00	D/N	1	0,15			0,00	D/N/Y	1	0,15	688
32			0,00	V/I	3	0,44			0,00			0,00	688
33	V	4	0,58	L/F	7	1,02	L/I; L/V	7	1,02		2	0,29	688
36	L; V	8	1,16	M/I	30	4,36	M/L; M/V	5	0,73			0,00	688
46	V	1	0,15	M/I; M/L; M/I/L	18	2,62	M/V	1	0,15			0,00	688
47			0,00	I/V	2	0,29			0,00	I/T/A/V	1	0,15	688
48	A; S	3	0,44	G/V	1	0,15	G/R/S	2	0,29	V/M	1	0,15	688
50			0,00	I/V	1	0,15			0,00			0,00	688
54	L; T	4	0,58	I/V	11	1,60	I/L	1	0,15	I/V/T/A	1	0,15	688
60	N	2	0,29	D/E	5	0,73			0,00			0,00	688
63	A;C;D;E;F;H;K;L;Q;R;S;T;V	95	13,81	L/P	23	3,34	L/H	1	0,15		34	4,94	688
69	K; N; Q; R; S	125	18,17			0,00	H/N; H/Q; H/R	7	1,02			0,00	688
71	G; I	6	0,87	A/T; A/V	24	3,49			0,00	A/T/I; A/V/I; T/I	3	0,44	688
73	C; T	8	1,16	G/S	7	1,02	G/A; G/C	2	0,29	G/S/T/A; G/S/T; S/T/C; T/A	4	0,58	688
77			0,00	V/I	30	4,36			0,00			0,00	688
82	I	14	2,03	V/A	9	1,31	V/I	4	0,58	T/A; V/A/I/T	3	0,44	688
84			0,00	I/V	9	1,31			0,00	I/A/V/T	1	0,15	688
88			0,00	N/D	3	0,44			0,00			0,00	688
90			0,00	L/M	12	1,74			0,00			0,00	688

Tab. 8: Auswertung aller AS-Positionen der Datenbank

4.2 Jahresauswertungen

Bei den nachfolgenden Jahresauswertungen erfolgt eine Betrachtung von zeitlichen Veränderungen im Auftreten bekannter Primärmutationen bezogen auf einzelne Jahre. Dies soll mögliche Veränderungen der Prävalenz in Bezug auf die jeweiligen Medikamente aufzeigen. Die Mischungen aus Wildtyp und Mutation wurden den Mutationen zugeordnet. Abbildung 10 zeigt eine allgemeine Übersicht.

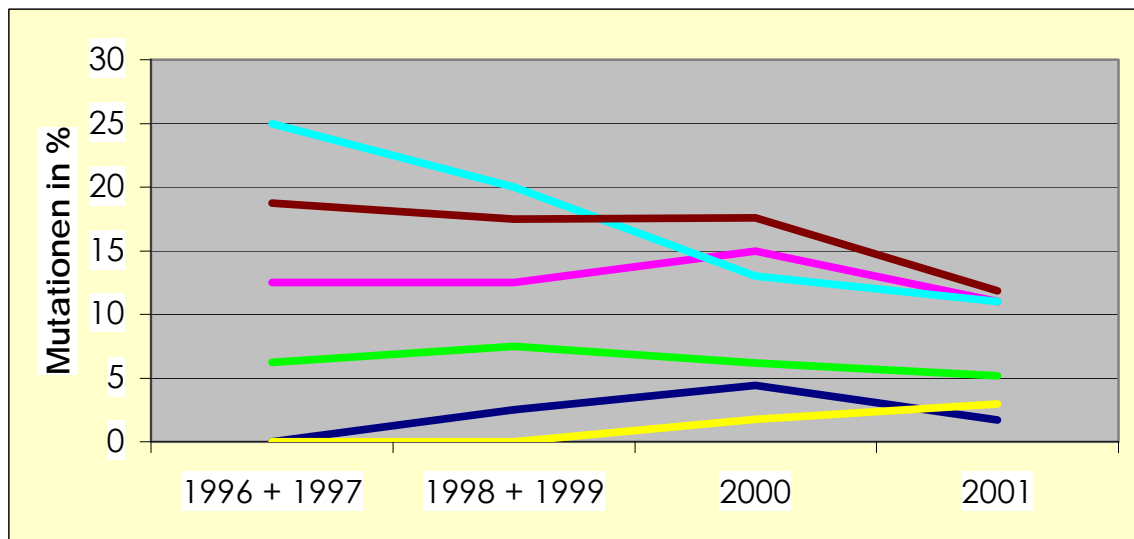


Abb. 10: Zeitliche Entwicklung der Mutationsprävalenzen aller mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen

blau:	AS 30
pink:	AS 46
gelb:	AS 48
türkis:	AS 82
grün:	AS 84
braun:	AS 90

Die folgenden Abbildungen 11-16 und Tabellen 9-14 der Jahresauswertungen stellen im zeitlichen Verlauf den Anteil des Wildtypes bzw. der Mutante für die einzelnen AS dar.

AS-Position 30:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 30	n	%	Mutatio- nen	n	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	D	16	100	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0
1998 + 1999	40	D	39	97,5	N	1	2,5	-	0	0	-	0	0	1
2000	227	D	217	95,6	N	10	4,4	-	0	0	-	0	0	10
2001	405	D	398	98,3	N	5	1,2	D/N	1	0,2	D/N/Y	1	0,2	7

Tab. 9: Jahresbetrachtung AS 30

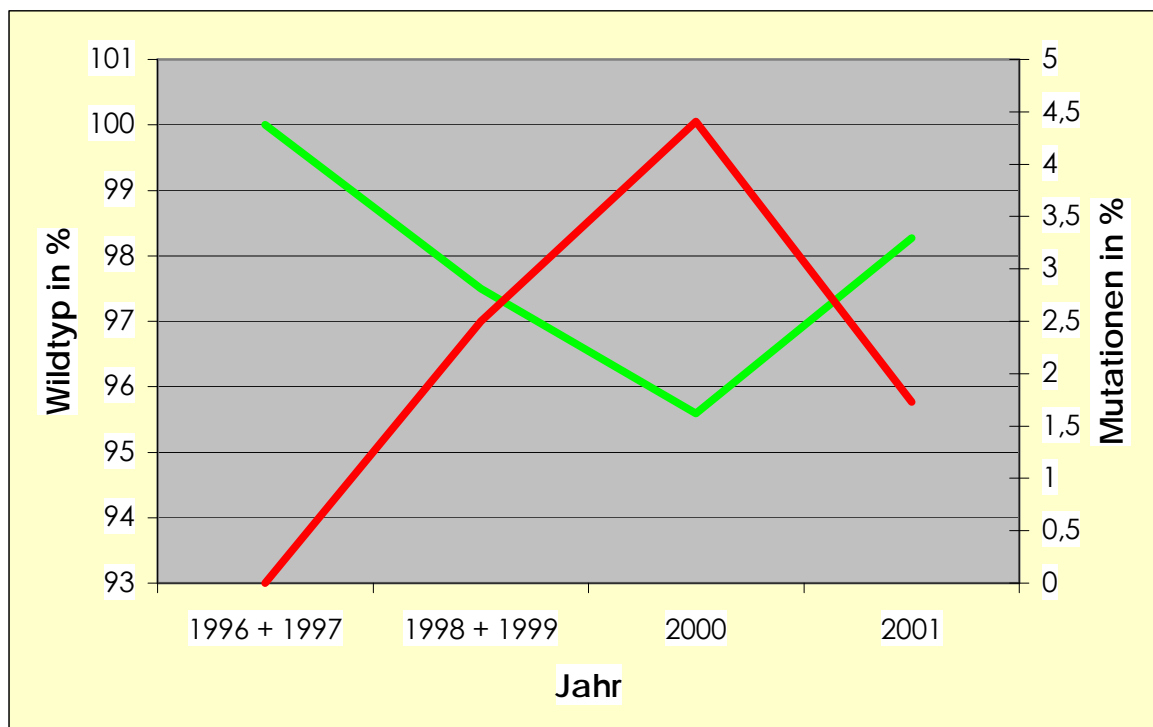


Abb. 11: Jahresbetrachtung AS 30
 grün: Wildtyp in %
 rot: Mutationen in %

Die zeitliche Auswertung der Prävalenz von Mutationen auf AS-Position 30 zeigt einen Anstieg der Mutationen bis zu einem Peak im Jahr 2000. Danach kam es zu einem Abfall der Mutationsrate.

AS-Position 46:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 46	n	%	Mutatio- nen	n	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	M	14	87,5	L	1	6,3	M/L	1	6,3	-	0	0	2
1998 + 1999	40	M	35	87,5	I	3	7,5	M/I	2	5	-	0	0	5
2000	227	M	193	85,0	I	17	7,5	M/I	4	1,8	-	0	0	34
					L	12	5,3							
					V	1	0,4							
2001	405	M	360	88,9	I	20	4,9	M/I	7	1,7	M/I/L	1	0,2	45
					L	13	3,2	M/L	3	0,7				
								M/V	1	0,2				

Tab. 10: Jahresbetrachtung AS 46

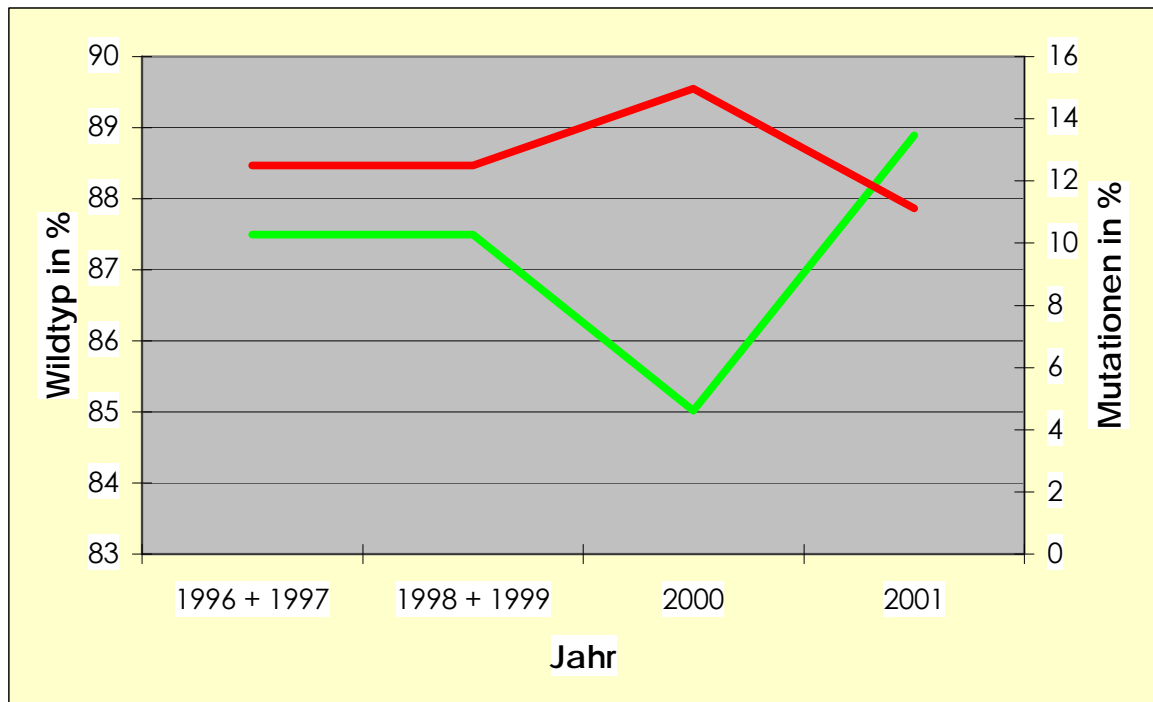


Abb. 12: Jahresbetrachtung AS 46

grün Wildtyp in %

rot: Mutationen in %

Die erste M46L-Mutation trat im März 1998 auf. Im Jahr 2000 kam es zu einem deutlichen Anstieg auf 34 Mutationen und in 2001 waren Mutationen bei 45 Proben zu finden. Insgesamt wiesen 40 der von uns untersuchten Proben die M46I- und 26 Proben die M46L-Mutation auf.

AS-Position 48:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 48	n	%	Mutatio- nen	n	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	G	16	100	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0
1998 + 1999	40	G	40	100	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0
2000	227	G	223	98,2	V	2	0,9	G/V	1	0,4	G/S/R	1	0,4	4
2001	405	G	393	97,0	A	2	0,5	-	0	0	G/S/R	1	0,2	12
					S	1	0,2				V/M	1	0,2	
					V	7	1,7							

Tab. 11: Jahresbetrachtung AS 48

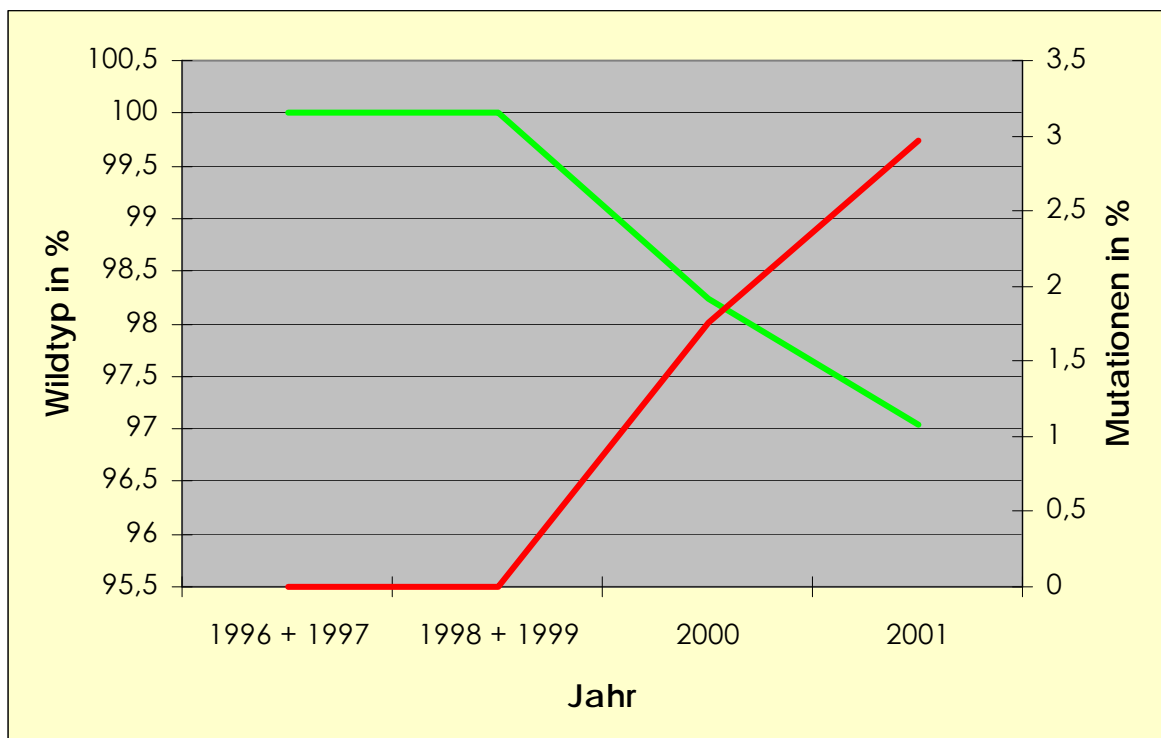


Abb. 13: Jahresbetrachtung AS 48

grün: Wildtyp in %

rot: Mutationen in %

In den ersten fünf Jahren nach Einführung von Saquinavir war bei unserem gesamten Patientenkollektiv ausschließlich der Wildtyp zu finden. Erst im Jahr 2000 konnten auf der AS-Position 48 erste Mutationen nachwiesen werden.

AS-Position 82:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 82	N	%	Mutatio- nen	n	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	V	12	75	A	1	6,3	-	0	0	-	0	0	4
					F	3	18,8							
1998 + 1999	40	V	32	80	A	1	2,5	V/A	1	2,5	T/A	2	5	8
					I	2	5,0			V/A/I/T	1	2,5		
					T	1	2,5							
2000	227	V	198	87,2	A	15	6,6	V/A	4	1,8	-	0	0	29
					F	2	0,9	V/I	2	0,9				
					I	4	1,8							
					T	2	0,9							
2001	405	V	360	88,9	A	22	5,4	V/A	4	1,0	-	0	0	45
					F	5	1,2	V/I	2	0,5				
					I	8	2,0							
					S	1	0,2							
					T	3	0,7							

Tab. 12: Jahresbetrachtung AS 82

Auf AS-Position 82 zeigte sich über die Jahre hinweg ein kontinuierlicher Abfall der Mutationsrate. Zu Beginn unserer Untersuchung lag die Mutationsprävalenz noch bei 25%.

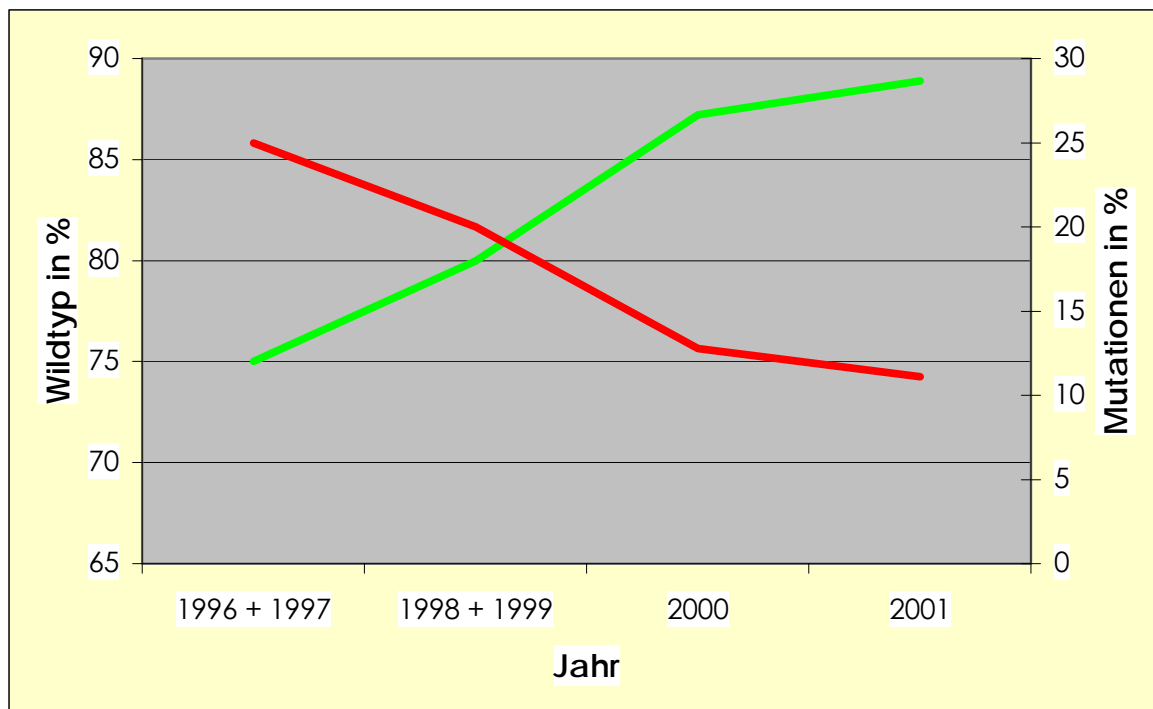


Abb. 14: Jahresbetrachtung AS 82
 grün: Wildtyp in %
 rot: Mutationen in %

AS-Position 84:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 84	N	%	Mutatio- nen	n	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	I	15	93,8	V	1	6,3	-	0	0	-	0	0	1
1998 + 1999	40	I	37	92,5	V	2	5,0	I/V	1	2,5	-	0	0	3
2000	227	I	213	93,8	V	9	4,0	I/V	5	2,2	-	0	0	14
2001	405	I	384	94,8	A	1	0,2	I/V	3	0,7	I/A/V/T	1	0,2	21
					V	16	4,0							

Tab. 13: Jahresbetrachtung AS 84

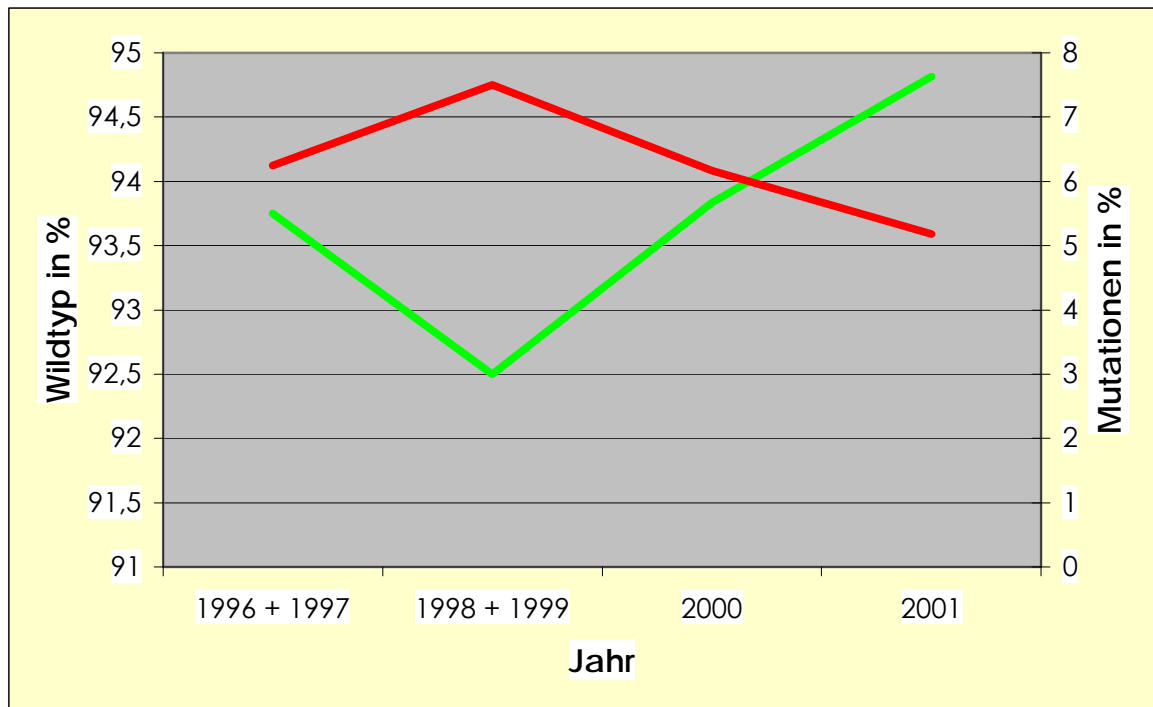


Abb. 15: Jahresbetrachtung AS 84

grün: Wildtyp in %

rot: Mutationen in %

Auf Position 84 entwickelte sich zunächst eine Zunahme der Mutationen. Nach Erreichen eines Peaks in 1998/1999 folgte eine Abnahme der Mutationsrate.

AS-Position 90:

Jahr	Patienten gesamt	Wildtyp AS 90	N	%	Mutatio- nen	N	%	Mix Wildtyp	n	%	Mix Sonstige	n	%	Summe Mutationen
1996 + 1997	16	L	13	81,3	M	2	12,5	L/M	1	6,3	-	0	0	3
1998 + 1999	40	L	33	82,5	M	7	17,5	-	0	0	-	0	0	7
2000	227	L	187	82,4	M	34	15,0	L/M	6	2,6	-	0	0	40
2001	405	L	357	88,1	M	43	10,6	L/M	5	1,2	-	0	0	48

Tab. 14: Jahresbetrachtung AS 90

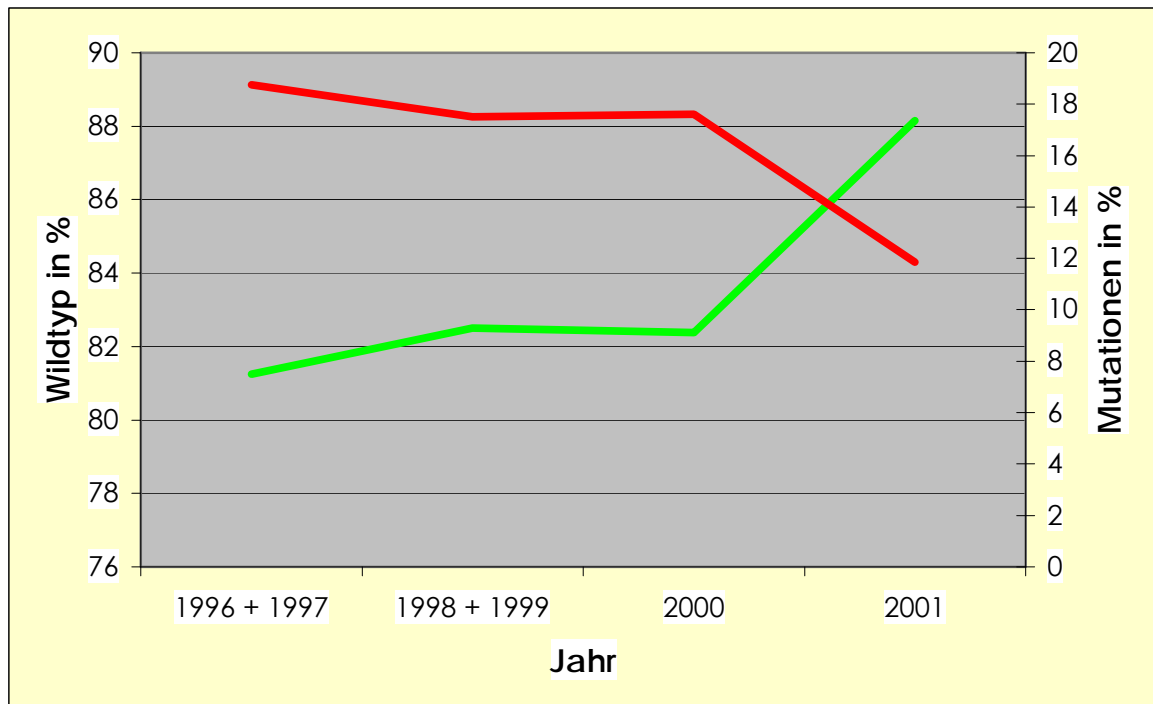


Abb. 16: Jahresbetrachtung AS 90
grün: Wildtyp in %
rot: Mutationen in %

Die Mutationsrate auf Position 90 bewegte sich über die Jahre 1995 bis 2000 auf relativ gleichbleibendem Niveau. 2001 zeigte sich ein Anstieg des Wildtyps auf fast 90%.

4.3 Low-Level-Auswertungen

Abbildung 17 zeigt die Einteilung der Low-Level-Patienten in PI-naive Patienten und solche, die während unseres Betrachtungszeitraumes mindestens eine PI-Medikation erhalten hatten. Die Grafik macht deutlich, dass bei etwa der Hälfte der ausgewerteten Patienten keine Primärmutationen unter PI-Therapie auftraten.

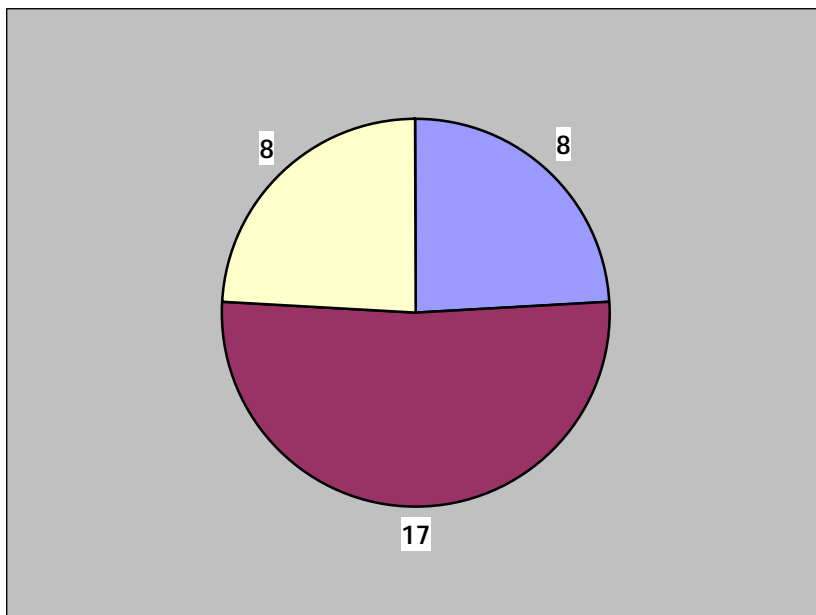


Abb. 17: Low-Level-Patienten
weinrot: PI-Medikation ohne Entwicklung von Primärmutationen
gelb: Primärmutationen unter PI-Therapie
blau: keine PI-Medikation

Der ersten Patientengruppe (PI-naiv) konnten 8 Patienten zugeordnet werden. Die Genotypisierungen ergaben hier im Bereich der PR keine Primärmutationen. Bei einem Patienten war ausschließlich der Wildtyp vorhanden. Alle anderen wiesen die in Tabelle 15 dargestellten Sekundärmutationen auf.

Mutation	L10I	K20R	M36I	D60E	L63C/P/V	H69K	A71I	V77I
Anzahl	1	1	3	1	3	2	1	2

Tab. 15: Verteilung der Sekundärmutationen bei PI-naiven Patienten

Bei den verbleibenden 25 Patienten mit PI-Vortherapie zeigten sich zwei unterschiedliche Ergebnisse:

⇒ 17 Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Sequenzierung keine Primärmutationen auf, trotz vorangegangener PI-Therapie.

⇒ Bei 8 Patienten fanden sich Primärmutationen.

Die Auswertung der Primärmutationen ergab bei den Low-Level-Patienten die in Tabelle 16 dargestellten Daten.

Patient	vorangegangene PI-Therapie	Primärmutation auf AS-Position
1 (SIWA)	IDV, RTV, NFV, SQV	46, 84, 90
2 (MAMA)	NFV	30, 46
3 (NOBA)	IDV, RTV	46, 84
4 (MIME)	IDV, RTV, INV, FOV, NFV	82, 90
5 (MEBI)	NFV	30
6 (HOFR)	IDV, RTV, NFV	30 (Mischung)
7 (MIBR)	IDV, RTV	82
8 (THZE)	NFV	30
(9)(STSC)	NFV	82

Tab. 16: Primärmutationen bei Low-Level-Patienten

4.4 Patientenverläufe

Aus dem Kollektiv der Low-Level-Patienten werden nachfolgend zwei Patienten im Hinblick auf die Entwicklung ihrer VL und CD4⁺-Zellen bezogen auf die jeweilige Therapie exemplarisch dargestellt.

Die nachfolgenden Abbildungen 18 und 19 zeigen die zeitliche Entwicklung der VL bzw. der CD4⁺-Zellen inklusive Zeitpunkte der Sequenzierungen und Therapiewechsel (inkl. ART-Pausen).

Die Tabellen 17 und 18 geben für jeden der beiden Patienten die Entwicklung der Mutationen anhand der Sequenzierungsdaten wider. Die Mutationen sind jeweils farblich unterlegt.

Patient 1:

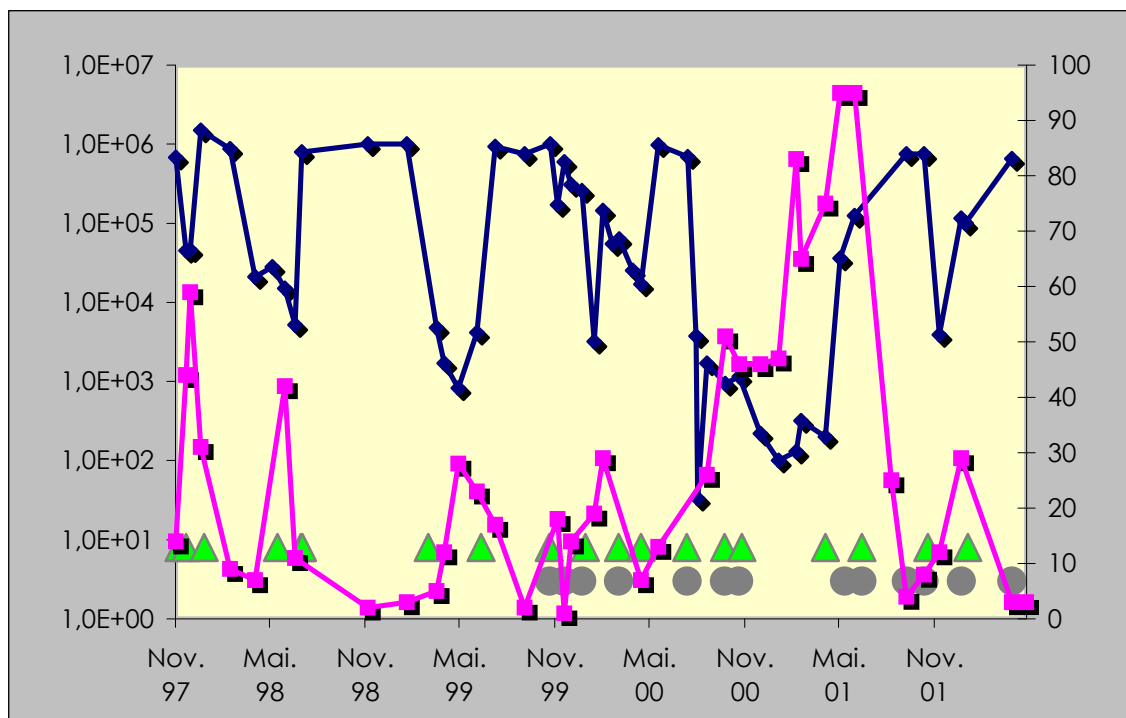


Abb. 18: VL- und CD4⁺ -Verläufe - Patient 1

blaue Verlaufslinie: VL-Entwicklung
 pinke Verlaufslinie: CD4⁺-Verlauf
 grüne Dreiecke: Therapiewechsel
 graue Kreise: Sequenzierung

	WT	L 10	K 20	L 24	D 30	V 32	L 33	M 36	M 46	I 47	G 48	I 50	I 54	L 63	A 71	G 73	V 77	V 82	I 84	N 88	L 90	
Sequ.																						
11/99	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
12/99	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
01/00	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
03/00	I	M/I	WT	WT	WT	WT	I	I	WT	WT	WT	WT	WT	P	V	S	WT	WT	V	WT	M	
08/00	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10/00	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
11/00	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	A/V	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
05/01	I	I	WT	WT	I	WT	I	I	V	WT	WT	WT	WT	P	V	S	WT	WT	V	WT	M	
07/01	I	I	WT	WT	I	WT	I	I	V	WT	WT	WT	WT	P	V	S	WT	WT	V	WT	M	
09/01	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	M/L	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10/01	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
01/02	I	I	WT	WT	V/I	L/F	I	I	I/V	WT	WT	WT	WT	P	A/V	S	WT	WT	I/V	WT	M	
04/02	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	P	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Tab. 17: Entwicklung der Mutationen – Patient 1

Patient 2:

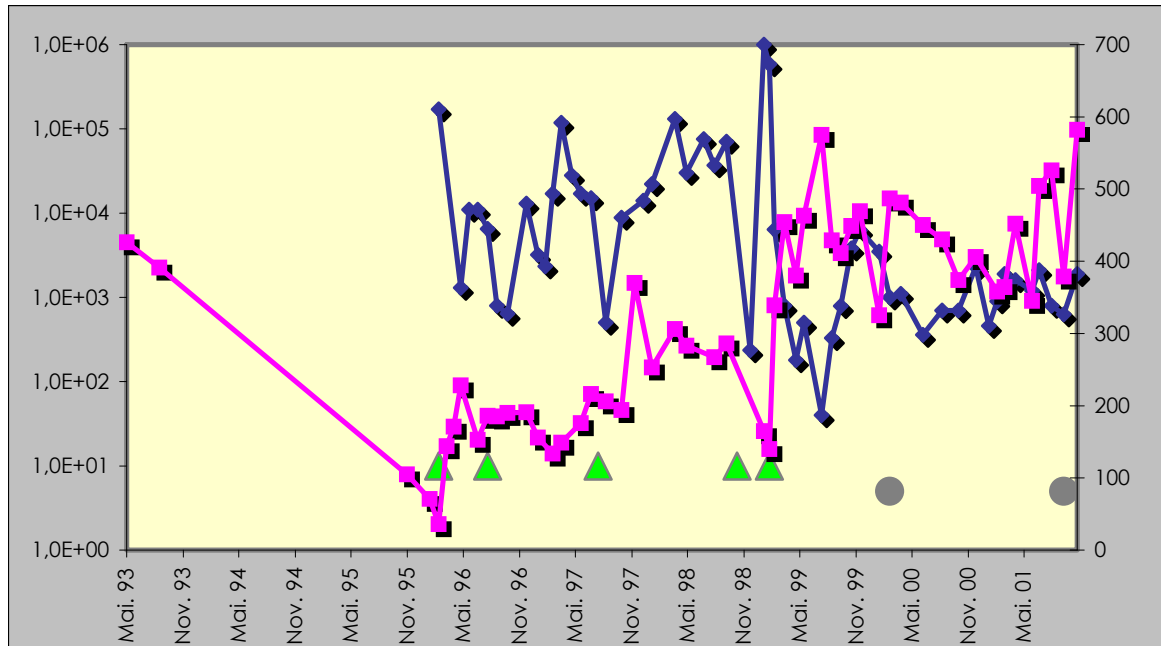


Abb. 19: VL- und CD4⁺-Verläufe - Patient 2
 blaue Verlaufslinie: VL-Entwicklung
 pinke Verlaufslinie: CD4⁺-Verlauf
 grüne Dreiecke: Therapiewechsel
 graue Kreise: Sequenzierung

	WT	L 10	K 20	L 24	D 30	V 32	L 33	M 36	M 46	I 47	G 48
Sequ.											
02/00	WT	WT	WT	N	WT	WT	WT	I	WT	WT	
09/01	WT	WT	WT	D/N	WT	WT	WT	I	WT	WT	

	WT	I 50	I 54	L 63	A 71	G 73	V 77	V 82	I 84	N 88	L 90
Sequ.											
02/00	WT	WT	T	T	WT	I	WT	WT	D	WT	
09/01	WT	WT	P	T	WT	I	WT	WT	D	WT	

Tab. 18: Entwicklung der Mutationen – Patient 2

4.5 Veränderungen der Mutationen

In der nachfolgenden Tabelle 19 bzw. Abbildung 20 sind Veränderungen von Mutationen dargestellt, die sich im Rahmen von Therapiewechseln und ART-Pausen (STI) bei 28 untersuchten Patienten zeigten. Mischungen wurden den Mutationen zugeordnet.

Mutation AS-Pos.	Anzahl der Mut. unter Therapie	MUT. WÄHREND THERAPIEPAUSE			Wechsel zum Mix	Mut. wiederge- kommen nach erneutem Therapiebeginn
		Mut. geblieben	Mut. ver- schwunden			
10:						
L 10 I + L/I	10	2	8	-	8	
L 10 F	-	-	-	-	1	
Summe 10	10	2	8	0	9	
16:						
G 16 A	1	1	-	-	-	
Summe 16	1	1	0	0	0	
20:						
K 20 I	2	-	2	-	2	
K 20 R	2	1	1	-	2	
Summe 20	4	1	3	0	4	
24:						
L 24 I	3	-	3	-	3	
Summe 24	3	0	3	0	3	
32:						
V 32 I	1	-	1	-	1	
Summe 32	1	0	1	0	1	
33:						
L 33 L/F	2	-	2	-	1	
Summe 33	2	0	2	0	1	
36:						
M 36 I + M/I	4	2	1	1	2	
M 36 V+ M/V	1	-	1	-	1	
Summe 36	5	2	2	1	3	

Mutation AS-Pos.	MUT. WÄHREND THERAPIEPAUSE				Mut. wiederge- kommen nach erneutem Therapiebeginn
	Anzahl der Mut. unter Therapie	Mut. geblieben	Mut. ver- schwunden	Wechsel zum Mix	
46:					
M 46 I + M/I	8	1	7	-	6
M 46 V	1	-	-	1	1
M 46 L	-	-	-	-	1
Summe 46	9	1	7	1	8
47:					
I 47 V	1	-	1	-	1
Summe 47	1	0	1	0	1
48:					
G 48 V + G/V	2	-	2	-	2
Summe 48	2	0	2	0	2
50:					
I 50 I/V	1	-	1	-	0
Summe 50	1	0	1	0	0
54:					
I 54 V + I/V	5	-	4	-	4
I 54 T	1	-	1	-	1
I 54 M	1	-	1	-	1
I 54 L	1	-	1	-	1
Summe 54	8	0	7	0	7
60:					
D 60 E	3	-	1	-	3
Summe 60	3	0	1	0	3
63:					
L 63 P + L/P	10	5	5	-	4
Summe 63	10	5	5	0	4
71:					
A 71 V	2	-	2	-	2
A 71 T	2	1	1	-	1
A 71 A/V	1	-	1	-	1
Summe 71	5	1	4	0	4
73:					
G 73 S	3	-	3	-	1
G 73 G/S	-	-	-	2	-
G 73 T	1	-	1	-	-
Summe 73	4	0	4	2	1

Mutation AS-Pos.	MUT. WÄHREND THERAPIEPAUSE				Mut. wiederge- kommen nach erneutem Therapiebeginn
	Anzahl der Mut. unter Therapie	Mut. geblieben	Mut. ver- schwunden	Wechsel zum Mix	
77:					
V 77 I + V/I	4	3	1	-	1
Summe 77	4	3	1	0	1
82:					
V 82 A + V/A	7	-	7	-	6
Summe 82	7	0	7	0	6
84:					
I 84 V	3	-	3	-	3
Summe 84	3	0	3	0	3
90:					
L 90 M	6	1	4	1	5
L 90 L/M	-	-	-	-	1
Summe 90	6	1	4	1	6

Tab. 19: Veränderungen der Mutationen

Abbildung 20 zeigt eine Übersicht der Mutationsprävalenzen unter antiretroviraler Therapie, während STI sowie nach erneutem Therapiebeginn bezogen auf die jeweiligen AS-Positionen. Eine Häufung der Mutationen zeigt sich bei dieser Untersuchung vor allem auf den Positionen 10, 46, 54 und 63.

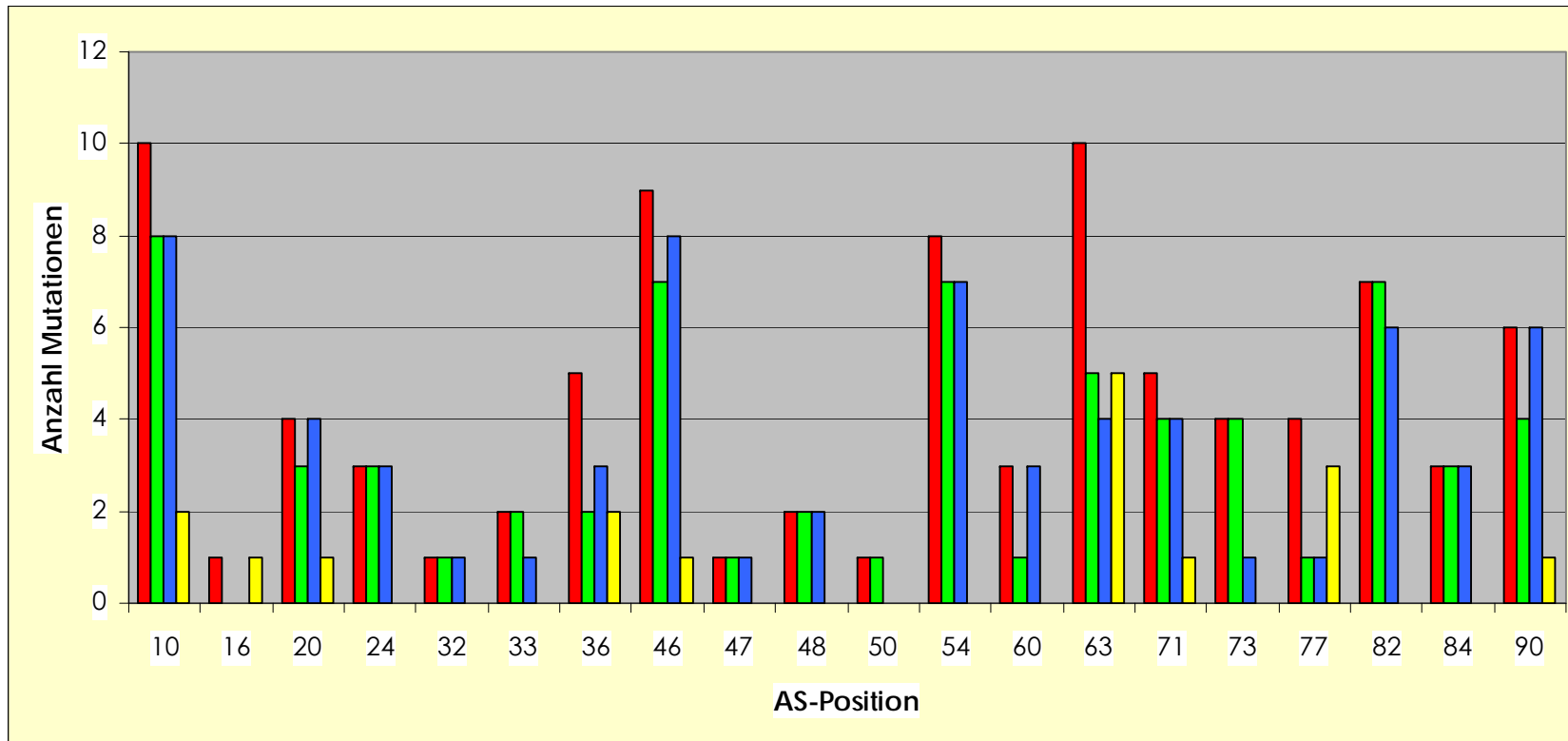


Abb. 20: Prävalenzänderungen bei STI

rot: Mutationen unter Therapie

grün: Mutationen verschwunden während STI

blau: Mutationen wiedergekommen

gelb: Mutationen geblieben

5 DISKUSSION

Die Fähigkeit der HI-Viren zur Selektion Medikamenten-resistenter Mutanten stellt in der Therapie der HIV-Infektion eine große Schwierigkeit dar. Therapieziel sollte daher die Reduktion der VL unter die Nachweisgrenze sein, um somit eine Selektion zu vermeiden bzw. zu verringern. Kann dieses Ziel nicht erreicht werden, erhöht sich deutlich die Gefahr für eine Selektion resistenter Mutanten mit nachfolgend vermindertem Ansprechen des jeweiligen Medikamentes und entsprechendem Therapieversagen. In diesem Falle sollte eine Genotypisierung durchgeführt werden, um die notwendigen Informationen in Bezug auf Resistenzmutationen zu erlangen, damit die antiretrovirale Medikation entsprechend angepasst werden kann. Dank der heutigen Möglichkeiten, aus Patientenblut das Virusgenom zu isolieren und anschließend die Genabschnitte der PR und der RT zu sequenzieren, können so mit Hilfe dieser Genotypisierung relevante Punktmutationen erkannt werden. Diese Informationen helfen dem behandelnden Arzt, Medikationen in Bezug auf mögliche Resistenzen anzupassen, um so eine virologisch optimale Therapie für den Patienten zu gewährleisten und ihn nicht durch eine insuffiziente Medikation unnötig zu belasten. Darüber hinaus gilt es, die Selektion weiterer Mutationen zu vermeiden.

Die nachfolgende Tabelle 20 zeigt eine Zusammenfassung der mit Resistenzen korrelierten AS-Positionen für die zum Zeitpunkt der Arbeit zugelassenen PIs. Farblich hervorgehoben sind die Positionen, die mit Primärmutationen assoziiert sind. Alle anderen Positionen stehen für Sekundärmutationen, die erst durch eine Summierung mehrerer Mutationen zu Resistenzen führen.

Indinavir	10	20	24	32	36	46			54	71	73	77	82	84	90	
Ritonavir	10	20		32	33	46			54	71		77	82	84	90	
Saquinavir	10						48		54	71	73	77	82	84	90	
Nelfinavir	10		30		36	46				71		77	82	84	88	90
Amprenavir	10			32		46	47	50	54		73		84		90	
Lopinavir/Rit.	10	20	24	32	33	46	47	50	53	54	63	71	73	82	84	90

Tab. 20: Mit Resistenzen assoziierte AS-Positionen

5.1 Allgemeine Datenbankauswertung

Die Erstellung und Auswertung einer Frankfurter HIV-Resistenz-Datenbank dient der Untersuchung von Prävalenzen von Primär- und Sekundärmutationen im HIV-Genom im Hinblick auf Resistenzentwicklungen für die jeweiligen ART-Medikamente.

Ein Teil der erarbeiteten Daten wurden als Poster auf dem Welt-AIDS-Kongress 2002 in Barcelona veröffentlicht (*Stürmer et al., 2002*) und in einer weiteren Publikation verwendet (*Staszewski et al., 2006*).

5.1.1 Primärmutationen

Die mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen (30, 46, 48, 50, 82, 84 und 90) sind für die Entstehung von Resistenzen von besonderer Relevanz und wurden daher schwerpunktmäßig untersucht (*Schinazi et al., 2000*).

Die Zuordnung der mit Resistenzen assoziierten AS-Positionen zu den Wirksubstanzen geht aus Tab. 20 hervor. Eine Ausnahme bildet hier das Medikament Kaletra[®], eine Kombination aus Lopinavir und Ritonavir. Hierfür sind derzeit noch keine Primärmutationen beschrieben.

Eine besondere Bedeutung fällt den Positionen 46, 82, 84 und 90 zu. Mutationen auf diesen Positionen führen zu Kreuzresistenzen zwischen verschiedenen Medikamenten. Dies bedeutet, dass eine Mutation beispielsweise auf AS-Position 84 unter Amprenavir-Therapie auch einen Wirkverlust der Medikamente Indinavir und Ritonavir zur Folge hat. Medikamente, die zur Entstehung von Kreuzresistenzen führen, sollten daher besser erst zu einem späteren Zeitpunkt der ART eingesetzt werden.

Saquinavir

Saquinavir war der erste Wirkstoff, der 1995 aus der Gruppe der PIs zugelassen wurde. Für diese Substanz sind derzeit die Mutationen G48V und L90M mit einer Primärresistenz assoziiert (*Eberle et al., 1995*). Bei unserem Patientenkollektiv fand sich die G48V-Mutation nur neun Mal. 97,7% der Patienten zeigten den Wildtyp. Die Mutationsrate der AS-Position 90 war sehr viel höher. Es zeigte sich lediglich bei 590 der 688 Proben (85,8%) der Wildtyp L. 86 Proben wiesen die AS M auf (12,5%); bei 12 zeigte sich die Mischung L/M (1,7%).

G48V als alleinige Mutation führt zu einem Wirkverlust von Saquinavir um das 3- bis 10-fache. Findet sich zusätzlich auch die L90M-Mutation, erhöht sich die Resistenz auf das zum Teil mehr als 100-fache (*Miller, 2002*). Von den fünf Patienten unseres Kollektivs, die eine G48V-Mutation aufwiesen, konnte bei zwei Patienten zusätzlich auch die L90M-Mutation isoliert werden.

Die Sekundärmutation K20R/M führt zu einer Erweiterung des Resistenzmaßes unter Saquinavir-Therapie. Dies wurde ebenfalls für die Mutationen A71V und I84A beschrieben. Besteht zusätzlich zur V82A/F-Mutation eine A71V/T- oder I54A-Mutation, bewirkt die L10I/F-Mutation eine High-Level-Resistenz für Saquinavir (>100fach) (*Servais et. al; 2001*). Bei 39 unserer Proben konnte die V82A-Mutation nachgewiesen werden, davon hatten 23 zusätzlich die A71V- und ein Patient die A71T-Mutation. 17 dieser Patienten zeigten darüberhinaus auch die Mutation L10I.

Indinavir

Bei der Substanz Indinavir sind zahlreiche AS-Positionen mit Resistenzen korreliert, wobei Primärmutationen für die Positionen 46, 82 und 84 beschrieben sind (*Condra et al., 1996; Zhang et. al, 1997*).

Untersuchungen von Condra et al. 1995 beschrieben auf AS-Position 46 nur die Substitution von M nach I als relevante Mutation (*Condra et al., 1995*). Aufgrund von späteren Studien in den Jahren 1996 und 1997 wurde ebenfalls die M46L-Mutation als resistenzbildende Mutation angesehen (*Condra et al., 1996; Vasudevachari et al., 1996; Zhang et al., 1997*). Neuere Untersuchungen von Maguire et al. ergaben in der Zwischenzeit, dass die M46L-Mutation nur noch als Sekundärmutation gewertet werden kann und somit allein die Mutation M46I auf dieser Position zur Primärresistenz führt (*Maguire et al., 2002; Re et al., 2004*).

Unsere Datenbankauswertung zeigte eine Mutationsprävalenz auf AS-Position 46 von 12,5%. 40 Proben (5,8%) wiesen die Mutation M46I auf und bei 26 Proben (3,8%) fand sich die AS L. 18 Patientenproben zeigten Mischungen mit relevanten Mutationen. Auf Position 82 sind die Mutationen V82A, V82F und V82T mit Resistenzen assoziiert. 602 der untersuchten Proben (87,5%) zeigten den Wildtyp V. V82A war bei 39 vorhanden (5,7%), V82F bei 10 Proben. Die Mutation T konnte sechs Mal gefunden werden. Die am häufigsten beobachtete Mutation in unserem untersuchten Patientenkollektiv war V82A. Bei einer Studie von medikamenten-naiven Patienten in Spanien zeigte sich V82A ebenfalls als die am häufigsten nicht vorhertherapierten Patienten eine Primärmutation. In 91,6% zeigte sich hierbei V82A (*Eiros et al., 2002*).

649 unserer Patientenproben wiesen auf Position 84 den Wildtyp I auf. Dies entspricht 94,3%. Die Mutation I84V fand sich bei 28 Proben (4%) und I84A bei einer Probe. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, ist die Mutation I84V im Hinblick auf Kreuzresistenzen von besonderer Bedeutung. Kreuzresistenzen sind vor allem

zwischen PIs der 1. Generation beschrieben, insbesondere zwischen Indinavir und Ritonavir, weniger zwischen diesen beiden und Saquinavir (*Condra et al., 1996*).

Ritonavir

Bei Ritonavir sind die mit Primärresistenz assoziierten Mutationen V82A, V82F, V82T, V82S sowie I84V. Die Daten entsprechen denen der Indinavir-Auswertung. Die AS-Positionen 82 und 84 gelten als Primärmutationen für die Substanzen Indinavir und Ritonavir (*Molla et al., 1996*). Bei Ritonavir zählt jedoch im Gegensatz zu Indinavir auch die Mutation V82S zu den Primärmutationen. Diese kam in unserer Datenbank nur ein einziges Mal vor.

Schmit et al. fand nach einjähriger Ritonavir-Therapie bei den untersuchten Patienten als häufigste Mutation V82A/F (*Schmit et al., 1996*). Wie bereits unter Indinavir beschrieben, zeigte sich bei unserem Patientenkollektiv V82A ebenfalls als häufigste Mutation und ist daher in unserer Auswertung hervorzuheben.

Ritonavir nimmt als Monosubstanz in der modernen ART heutzutage keine Rolle mehr ein, sondern wird fast ausschließlich in Medikamentenkombinationen zur Boosterung eingesetzt und spielt in diesem Bereich eine elementare Rolle. Als Beispiel hierfür ist das Medikament Kaletra® zu nennen, ein Kombinationspräparat aus Lopinavir und low-dose Ritonavir, also der zusätzlichen Gabe einer niedrigen Dosis Ritonavir.

Nelfinavir

Die mit Primärresistenz assoziierten Mutationen befinden sich bei Nelfinavir auf den AS-Positionen 30 und 90. Bei dem Frankfurter Patientenkollektiv zeigte die AS-Position 30 eine nur sehr geringe Mutationsrate. Bei lediglich 16 Patientenproben

(2,3%) fand sich eine Mutation vom Wildtyp D nach AS N. Alle anderen Proben wiesen den Wildtyp auf. Auch bei Untersuchungen in Italien wies die AS-Position 30 mit nur 2,7% eine geringe Mutationsprävalenz auf (*Manfredi et al., 2002*).

Studien der Rockefeller University in New York haben gezeigt, dass es sich bei der ersten Resistenzmutation, die unter Nelfinavir-Therapie auftritt, um die D30N-Mutation handelt. Darüber hinaus konnten in vitro keine phänotypischen Kreuzresistenzen zu anderen Protease-Inhibitoren beschrieben werden (*Markowitz et al., 1998*).

In vitro Untersuchungen in Neuseeland ergaben ebenfalls, dass die alleinige D30N-Mutation zu einer Resistenz für Nelfinavir führt, aber nicht mit einer verminderten Ansprechbarkeit für die Substanzen Indinavir, Ritonavir und Saquinavir verbunden ist (*Jarvis et al., 1998*). Eine Erklärung hierfür bieten verschiedene genotypische Untersuchungen, die zeigen, dass keine der übrigen bis heute zugelassenen PI-Mutationen auf der AS-Position 30 hervorrufen. Es sind daher derzeit keine Kreuzresistenzen zu anderen Medikamenten bekannt (*Patick et al., 1998; Bardsley-Elliot et al., 2000; Clotot et al., 2002*). Ebenso scheint die D30N-Mutation, stärker als die L90M, die virale Fitness zu beeinträchtigen (*Martinez-Picado et al., 1999*).

Bei der Position 90 handelt es sich um die Zweite der beiden Primärmutationen von Nelfinavir. Mutationen der Position 90 waren bei unserem Patientenkollektiv sehr viel häufiger zu finden. Es zeigte sich lediglich bei 590 der Proben (85,8%) der Wildtyp L. 86 Proben wiesen die Mutation L90M auf (12,5%). Bei 12 zeigte sich die Mischung L/M (1,7%). Die AS-Position 90 weist, im Gegensatz zur Position 30, eine Kreuzresistenz mit der Substanz Saquinavir auf. Untersuchungen in Brasilien von Tanuri et al. zeigten die L90M als Hauptmutation der Protease bei 26% der unter HAART-Therapie stehenden Patienten. Bei 84,7% kam es nach Auftreten dieser Resistenzmutation zum Therapieversagen. Die Mutationen korrelierten eindeutig mit der Therapie (*Tanuri et al., 2002*). Ähnliche Ergebnisse wurden in England veröffentlicht. Auch hier wurde die L90M als Hauptmutation bei vortherapierten Patienten beschrieben, wohingegen die D30N-Mutation nur selten auftrat (*Cane et al., 2001*). Die Häufigkeit der L90M-Mutation hat zur Folge, dass für eine Vielzahl

von Patienten die Substanz Nelfinavir im Therapiekonzept durch ein anderes Medikament ersetzt werden muß und Saquinavir nicht mehr oder nur sehr eingeschränkt einsetzbar ist.

Bei Studien in Dänemark und Spanien fiel die Verteilung der Mutationen auf den AS-Positionen 30 und 90 entgegengesetzt aus. In Dänemark wiesen 38% der untersuchten Patienten unter Nelfinavir-Therapie die D30N-Mutation auf, wohingegen sich nur bei 19% die L90M-Mutation nachweisen ließ (*Roge et al., 2003*). In Spanien zeigte sich, ebenfalls unter Nelfinavir-Therapie, bei 30,7% der untersuchten Patientenproben die Mutation D30N, lediglich hingegen bei 4,8% die L90M-Mutation (*Clotet et al., 2002*).

Bei Untersuchungen von Manfredi et al. zeigte Nelfinavir eine nur sehr geringe Primärmutationsrate. Nur drei der 233 untersuchten Patienten entwickelten eine isolierte D30N-Mutation. Diese führte jeweils zu einem virologischen Versagen. Bei diesen drei Patienten handelte es sich um initial ART-naive Patienten, die auf eine anschließende Therapieumstellung sofort gut ansprachen. Von den vielfach vortherapierten Patienten mit multiplen Mutationen, die unter Nelfinavir versagten, hatte keiner eine D30N-Mutation entwickelt (*Manfredi et al., 2002*).

Die Unterschiede in der Prävalenz von Mutationen auf den AS-Positionen 30 und 90 scheinen dahingehend zu bestehen, ob Nelfinavir als Monotherapie oder im Rahmen einer Kombinationstherapie eingenommen wird bzw. ob der Patient vortherapiert ist. In den Fällen, in denen die Patienten ausschließlich Nelfinavir erhielten, zeigte sich eine deutliche Prävalenz der D30N-Mutation. Patienten unter Kombinationstherapie, bei welcher Nelfinavir sowohl mit anderen PIs als auch mit NRTIs kombiniert wurde, entwickelten häufiger eine L90M-Mutation (*Miller, 2001*). Darüber hinaus scheint die Ausprägung von Resistenzmutationen mit dem Subtyp von HIV-1 assoziiert zu sein. Untersuchungen von Grossman et al. zeigten die D30N-Mutation nach Nelfinavir-Therapie bei 23% der Patienten mit Subtyp B, hingegen nur bei 7% der Patienten mit Subtyp C. In der Prävalenz der L90M-Mutation konnte hier jedoch kein Unterschied gefunden werden (*Grossman et al., 2004*). Ebenso

fanden sich bei Ariyoshi et al. bei Therapieversagern die Mutationen D30N, A71V und N88D ausschließlich bei Patienten mit dem Subtyp B im Vergleich zum Subtyp CRF01_AE (Ariyoshi et al., 2003).

Ein besonders wichtiger Aspekt bei der Betrachtung von Nelfinavir ist die Tatsache, dass es sich hierbei zum Zeitpunkt der Auswertung um den einzigen zugelassenen PI handelt, bei dem keine Boosterung erfolgt. Dies stellt, neueren Studien zufolge, in der antiretroviralen Therapie ein entscheidendes Kriterium dar (MacManus et al., 2004; Kempf et al., 2004). Im Vergleich mit einem geboosterten PI (Lopinavir/r), jeweils in Kombination mit einem NRTI, entwickelten 45% der mit Nelfinavir behandelten Patienten eine der beiden Primärmutationen (D30N/L90M). Bei den mit dem geboosterten Lopinavir therapierten Patienten konnte hingegen keine Resistenzmutation isoliert werden. Ebenso zeigte sich bei dem NRTI, der mit Nelfinavir kombiniert wurde (Stavudine), eine signifikant höhere Mutationsrate. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl bei PI-naiven als bei vortherapierten Patienten (Kempf et al., 2004). Die SOLO-Studie beschreibt ähnliche Ergebnisse und wird unter Amprenavir diskutiert.

Darüber hinaus ist Nelfinavir auch in der Therapie von Schwangeren und Kindern zugelassen und ist aufgrund der relativ guten Verträglichkeit auch für Patienten geeignet, die andere PIs nur schlecht tolerieren (Perry et al., 2005).

Amprenavir

Die mit einer Primärresistenz assoziierten Mutationen sind für Amprenavir die I50V- sowie die I84V-Mutation. Die Mutation I50V konnte in unserem Patientenkollektiv jedoch nicht gefunden werden. Bei einer Probe fand sich die Mischung I/V. Alle anderen entsprachen dem Wildtyp I (99,85%). Dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, dass nur wenige Patienten in unserem Kollektiv Amprenavir im Rahmen ihrer ART erhielten und sich daher die für Amprenavir spezifische Mutation nicht selektiert wurde.

Bei Resistenz-Untersuchungen des Laboratoire de Rétrovirologie in Luxemburg konnte bei Patienten unter Ritonavir-, Indinavir- und Saquinavir-Therapie weder die I50V, als typische Amprenavir-Mutation, noch die D30N-Mutation, als Resistenzmutation von Nelfinavir, gefunden werden (*Servais et al.; 2001*). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Untersuchungen dahingehend überein, dass die Ausbildung dieser medikamentenspezifischen Mutationen direkt mit der vorangegangenen Medikation assoziiert ist.

Eine Studie von GlaxoSmithKline in North Carolina, USA, zeigte die I84V-Mutation als stärksten Resistenz-Marker für Amprenavir bei PI-vortherapierten Patienten (*Paulsen et al., 2002*). Diese Mutation zeigte sich bei etwa 4% des von uns untersuchten Patientenkollektivs und ist daher bei diesen Patienten im Hinblick auf die Wahl der antiretroviralen Substanz von Belang. Dies auch vor allem, wenn man die Kreuzresistenzen zwischen Amprenavir und Lopinavir auf den AS-Positionen 50 und 84 miteinbezieht (*Paulsen et al., 2002; Prado et al., 2002; Parkin et al., 2003*).

Die Ausbildung von Resistenzmutationen kann mit Hilfe der Boosterung beeinflusst werden. Die SOLO-Studie verglich über 48 Wochen bei ART-naiven Patienten die Entwicklung von Mutationen in der Therapie mit Nelfinavir und geboostertem Amprenavir (Amprenavir/r), jeweils in Kombination mit einem NRTI. In der Gruppe der mit Amprenavir/r behandelten Patienten entwickelte kein Patient unter der Therapie eine Resistenzmutation für einen PI, weder für Amprenavir, noch in Bezug auf Kreuzresistenzen zu anderen PIs. 84% zeigten auch für den NRTI keine Resistenzmutation. Bei der Gruppe der mit Nelfinavir behandelten Patienten konnte bei 39% der Therapieversager eine Nelfinavir-assoziierte Mutation gefunden werden. 31% zeigten die D30N, 6% die L90M, und bei 2 Patienten fand sich die Kombination D30N/L90M. Zusätzlich konnte bei 14% die Primärmutation M46I/L isoliert werden (*MacManus et al., 2004*).

Lopinavir / Kaletra®

Der im Jahr 2000 zugelassene Protease-Hemmer Kaletra®, eine Kombination aus Lopinavir und low-dose Ritonavir, nimmt in der Betrachtung der Resistenzentwicklung eine Sonderstellung ein. Für dieses Medikament sind derzeit noch keine Primärmutationen beschrieben, allerdings stellen die Positionen 10, 20, 24, 46, 53, 54, 63, 71, 82, 84 und 90 relevante Sekundärmutationen dar. Ebenso scheint bei der Entwicklung der Lopinavir-Resistenz ein linearer Zusammenhang zwischen Virusreplikation und Anzahl der auftretenden Mutationen zu bestehen (*Kempf et al., 2001; Parkin et al., 2003*). In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass ansteigende Lopinavir-Konzentrationen mit einem vermehrten Auftreten von Mutationen im Protease-Gen verbunden (I84V, L10F, M46I, T91S, V32I, I47V) (*Carrillo et al.; 1998*). Vor allem die Mutationen I54V und V82A/F führten in einer Studie an HIV-infizierten Kindern zu einer reduzierten antiviralen Wirksamkeit (*Jimenez et al., 2005*).

Obwohl die aktuellen Therapierichtlinien von Kombinationsbehandlungen ausgehen, konnte Kaletra® auch als Monotherapie sehr gute Resultate in der Reduktion der VL zeigen (*Arribas et al., 2005*). Untersuchungen der Universität Bonn verglichen die Wirksamkeit von low-dose-Ritonavir-geboosterten PIs, wie Kaletra®, mit ungeboosterten Substanzen. Auch hier zeigte sich eine Überlegenheit der geboosterten Medikamente, welche als first-line-Medikation empfohlen werden (*Lichterfeld et al., 2003*).

5.1.2 Sekundärmutationen

Mutationen auf spezifischen AS-Positionen müssen im Hinblick auf die mögliche Resistenzentwicklung jeweils für die einzelnen Medikamente gesondert bewertet werden. Die alleinige Sekundärmutation führt in der Regel nicht zu einem sofortigen Wirkverlust. Durch eine Akkumulation von Sekundärmutationen ist

jedoch auch hier die Ausbildung einer signifikanten phänotypischen Resistenz möglich (*Molla et al., 1996*). Servais et al. untersuchte bei PI-naiven Patienten die Auswirkungen von Sekundärmutationen unter Indinavir-, Ritonavir- und Saquinavir-Therapie auf die phänotypische Resistenzentwicklung. Auch ohne den Nachweis von Primärmutationen kam es zu einer Resistenzentwicklung mit nachfolgendem Therapieversagen, was die Bedeutung der Genotypisierung auch im Bereich der Sekundärmutationen deutlich macht (*Servais et al.; 2001*).

Die **AS-Position 10** gehört zu den Sekundärmutationen und wurde bisher noch bei keiner Substanz mit einer Primärresistenz assoziiert. Sie ist allerdings bei allen derzeit zugelassenen PIs als Sekundärmutation beschrieben. Die Auswertung der Datenbank zeigte auf der AS-Position 10 bei 522 der insgesamt 688 Patientenproben den Wildtyp L. Dies entspricht 75,87%. Bei 24,13% zeigten sich Mutationen bzw. Mischungen von Wildtyp und Mutationen.

Eine Studie der Federal University of Rio de Janeiro, Brasilien, mit Medikamenten-naiven Patientenproben der Jahre 1996 bis 1998 zeigte - ähnlich unserer Auswertung - bei 23,8% ein Auftreten von Mutationen auf der AS-Position 10. Die Prävalenz von Mutationen auf AS-Position 10 bei vortherapierten Patienten ähnelt der Medikamenten-naiver Patienten (*Brindeiro et al., 2003*). Vor allem die Mutationen L10I sowie L10V werden mit einer vermehrten Progredienz der klinischen Parameter in Verbindung gebracht (*Servais et al.; 2001*).

AS-Position 16 ist bisher nicht mit Resistenzen assoziiert und nimmt daher in der Betrachtung eher eine untergeordnete Rolle ein. Unsere Auswertung zeigte hier in 95,8% den Wildtyp G.

Die Mutationen **K20R und K20M** sind für die Substanzen Indinavir, Ritonavir, Lopinavir und Atazanavir als Sekundärmutationen beschrieben. Diese fanden sich in der Datenbank bei 6 (K20M) bzw. 25 Proben (K20R). 51 Proben wiesen die Mutationen I, T und V auf, die jedoch zurzeit nicht mit Resistenzen korreliert sind.

Auf der **AS-Position 24** fand sich in unserem Kollektiv bei 98% der Wildtyp L. Diese Position ist relevant für die Substanzen Indinavir, Lopinavir sowie Atazanavir (L24I).

Die **Positionen 32** und **33** gehören ebenfalls zu den AS-Positionen mit nur geringer Mutationsprävalenz. In unserer Datenbank fand sich fast ausschließlich der Wildtyp (V32 bei 99% und L33 bei 96% der Proben). Neueste Untersuchungen von Svicher et al. beschreiben die L33F-Mutation als Resistenz-relevant für Lopinavir (*Svicher et al., 2005*).

Auf **AS-Position 36** konnten hingegen häufig Mutationen isoliert werden. Die für die Substanzen Indinavir, Nelfinavir und Atazanvir mit Resistenz assoziierte Mutation M36I fand sich bei 185 der untersuchten Proben (27%).

Für die Medikamente Amprenavir, Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®), Nelfinavir und Ritonavir stellt die **AS-Position 46** eine relevante Sekundärmutation dar. Diese ist für die Beurteilung von Kreuzresistenzen von besonderer Bedeutung, da diese Position für alle PIs außer Saquinavir mit Resistenzen assoziiert ist (*Condra et al., 1995*). 12,5% der Frankfurter Proben wiesen hier Mutationen auf.

Mutationen auf den **Positionen 47, 48** und **50** konnten nur selten gefunden werden. Position 47 zeigte bei 99% der Proben den Wildtyp I und ist relevant für die Substanzen Amprenavir und Lopinavir. Position 48 ist als Sekundärmutation lediglich für Atazanavir beschrieben. Auch hier fand sich überwiegend der Wildtyp G (98%). Position 50 zeigte von allen untersuchten AS-Positionen die niedrigste Mutationsrate mit 0,15%.

AS-Position 54 ist eine mit Sekundärresistenz assoziierte Position, die – mit Ausnahme von Nelfinavir - in der Literatur für alle Substanzen beschrieben wird. Die häufigste gefundene Mutation stellte die I54V dar; sie fand sich bei 42 Proben (6,1%). Der Wildtyp I war bei 91% vorhanden.

Mutationen auf **Position 63** sind die am häufigsten gefundenen Mutationen der

PR. In unserer Auswertung zeigte sich lediglich in 23% der Wildtyp L. Mutationen auf AS-Position 63 sind auch bei medikamenten-naiven Patienten häufig vertreten, da L63P zum natürlichen Polymorphismus der PR gehört. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei den Mutationen L63P sowie L63A um kompensatorische Mutationen handelt, die durch eine Verbesserung der viralen Fitness für die Virusreplikation einen Vorteil bringen (*Eastman et al., 1998; Martinez-Picardo et al., 1999*).

Die Mutationen **A71V** und **A71T** sind für alle Substanzen außer Amprenavir von Bedeutung. Diese fanden sich bei 5% (A71T) bzw. 11% (A71V) der untersuchten Proben. Als zusätzliche Mutation führen die Sekundärmutationen A71V sowie A71T zu einer vermehrten Resistenzbildung für die Substanzen Ritonavir, Indinavir sowie Nelfinavir (*Servais et. al; 2001*).

Bei Untersuchungen in Frankreich von Chaix et al. konnte die **V77I**-Mutation ausschließlich bei Infektionen gefunden werden, die durch den Subtyp B hervorgerufen wurden (*Chaix et al., 2003*). Bei unserem Patientenkollektiv lag die Mutationsrate auf dieser Position bei 33%, dabei war auch hier die V77I-Mutation hauptsächlich mit Subtyp B assoziiert (97,3%). Jedoch trugen auch Proben mit den Subtypen CRF02AG, D, A, C, CRF06CPX und J diese Mutation (Prävalenz $\leq 1\%$).

Die Mutation **N88S** gehört zu den Sekundärmutationen, die unter Nelfinavir-Therapie beschrieben sind. Diese Mutation scheint jedoch auch positive Auswirkungen für den Virusträger mit sich zu bringen. Untersuchungen der University of North Carolina, USA, konnten das Vorhandensein der N88S-Mutation mit einem gesteigerten Ansprechen auf die Substanz Amprenavir in Verbindung bringen. Darüber hinaus scheint sie ebenso in Zusammenhang mit einer verminderten viralen Fitness, einer reduzierten Replikationskapazität sowie einer verminderten Infektiosität zu stehen (*Resch et al., 2002*). Die Mutation N88S trat in unserem Patientenkollektiv nur einmal auf. Die Mutation N88D fand sich 13 Mal. Der Wildtyp N hatte eine Häufigkeit von fast 98%.

5.1.3 Jahresauswertungen

Die Untersuchung zeitlicher Veränderungen von Mutationsprävalenzen einzelner AS-Positionen stellt ein wichtiges Instrument zur Beurteilung der Wirksamkeit anti-retroviraler Medikamente dar. Die zeitlichen Verläufe spiegeln die Entwicklung von Mutationen wider und können durch die Zuordnung zu einzelnen Substanzen wichtige Hinweise für ein optimales therapeutisches Konzept geben. Da die HIV-Therapie keiner starren Gesetzmäßigkeit unterliegt, eignet sich diese Art der Untersuchung besonders, um Trendveränderungen in der Resistenzentwicklung zu erkennen und diesen somit frühzeitig begegnen zu können.

Die Jahresauswertung der Mutationsprävalenzen des Frankfurter Patientenkollektivs konzentrierte sich auf die mit Primärresistenz assoziierten AS-Positionen. Diese Untersuchung zeigte bei der PR unterschiedliche Verläufe, die in drei Gruppen zusammengefaßt werden können.

Verlaufstyp 1:

⇒ **kontinuierlicher Anstieg der Mutationsrate bis zum Erreichen eines Peaks, danach Rückgang der Mutationen**

Dieser Verlauf zeigte sich bei den AS-Positionen 30, 46 und 84 .

Jahresbetrachtung AS-Position 30:

Mutationen auf dieser Position werden derzeit nur der Substanz Nelfinavir zugeordnet. Die Ersteinführung des Medikamentes Viracept durch den Hersteller Agouron Pharmaceuticals erfolgte im März 1997. Mit einer zeitlichen Verzögerung von knapp einem Jahr trat im Februar 1998 erstmals bei einem Patienten unseres Kollektivs die D30N-Mutation auf. Die Mutationsprävalenz erreichte im Jahr 2000 ihr Maximum und fiel danach kontinuierlich ab.

Jahresbetrachtung AS-Position 46:

AS-Position 46 gilt als Primärmutation für die Substanz Indinavir. Die Ersteinführung erfolgte unter dem Handelsnamen Crixivan im März 1997 durch die Firma Merck. Erste Mutationen zeigten sich bei dem Frankfurter Kollektiv erst ein Jahr später, im März 1998, als M46L-Mutation. Die Mutationsrate erreichte auch hier ihren Peak im Jahr 2000. Obwohl die AS-Position 46 eine relevante Sekundärmutation von Kaletra® darstellt, kam es nach dessen Markteinführung im September 2000 dennoch zu einem Abfall der Mutationsrate.

Jahresbetrachtung AS-Position 84:

Position 84 ist als Primärmutation für die Substanzen Indinavir, Ritonavir sowie Amprenavir von Bedeutung. Von der prozentualen Verteilung her ergaben sich nur geringfügige Schwankungen in der Prävalenz der Mutationen. Die erste Mutation zeigte sich bereits im Juni 1996, drei Monate nach Einführung von Indinavir und Ritonavir. Da Amprenavir erst im April 1999 und Kaletra® im September 2000 eingeführt wurden, muß das Auftreten der I84V-Mutation in den Jahren zuvor Indinavir bzw. Ritonavir zugeordnet werden.

Bei Untersuchungen der Mutationsprävalenz der PR von Tamalet et al. in den Jahren 1997–2002 zeigte sich bei den 3915 Proben von ART-vorththerapierten Patienten ein ähnlicher Verlauf. In den Jahren 1997 und 1998 kam es zu einem Anstieg der Resistenz-relevanten Mutationen. Diese Entwicklung erreichte ihr Maximum 1999 mit 50,9%. Anschließend zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Mutationsrate bis auf 41,7% im 1. Quartal 2002 (*Tamalet et al., 2003*).

Der Rückgang der Mutationsprävalenz nach Erreichen eines Peaks kann in einer vermehrten Verordnung von Dreifach-Medikamenten-Kombinationen begründet sein, die aufgrund einer verstärkten Suppression der Virenreplikation, bspw. durch RTV-Boosterung, zu einer geringeren Ausbildung von Mutationen führen.

Verlaufstyp 2:

⇒ **geringe kontinuierliche Zunahme der Mutationen**

Diese Art des Verlaufs zeigte AS-Position 48.

Jahresbetrachtung AS-Position 48:

Mutationen auf der Position 48 scheinen bisher ausschließlich Saquinavir-assoziiert zu sein. Obwohl Saquinavir bereits im Dezember 1995 eingeführt wurde, ergaben unsere Auswertungen für die Jahre 1996, 1997, 1998 und 1999 keinerlei Mutationen auf dieser Position, ebenso keine Mischungen von Wildtyp und Mutation. Im November 1997 wurde die Substanz Saquinavir in einer weiteren Formulierung (Fortovase) eingeführt. Dennoch fanden sich bei unserem Patientenkollektiv erst im Jahre 2000 bei 1,8% der untersuchten Proben erste Mutationen. Auch im Jahr 2001 wiesen noch 97% der Proben den Wildtyp auf.

Die Ausbildung von Mutationen auf AS-Position 48 nach Saquinavir-Therapie ist bei unserem Patientenkollektiv nur gering. Vielmehr zeigte sich unter dieser Substanz eine Entwicklung von Mutationen auf AS-Position 90. Untersuchungen von Adje et al. ergaben keine Differenzierung in der Prävalenz der Saquinavir-assoziierten Mutationen G48V und L90M. Beide Mutationen wurde bei einem Patientenkollektiv von 68 vortherapierten Patienten je einmal beschrieben (*Adje et al., 2001*).

Die Zunahme von Mutationen auf einer spezifischen AS-Position kann unterschiedliche Gründe haben:

- Zunahme der Verordnungen der entsprechenden Medikamente
- Die Einführung eines neuen Medikamentes, welches in diesem Bereich ebenfalls Mutationen hervorruft
- Suboptimale Therapie mit nachfolgend erhöhter Virusreplikation
- Mangelnde Patienten-Compliance

Verlaufstyp 3:

⇒ tendentieller Rückgang der Mutationen

Diesem Verlaufstyp können die AS-Positionen 82 und 90 zugeordnet werden.

Jahresbetrachtung AS-Position 82:

Obwohl die Substanzen Indinavir und Ritonavir beide erst im März 1996 eingeführt wurden, konnte bereits in diesem Monat die erste Mutation auf dieser Position isoliert werden. Diese Mutation kann jedoch ebenso der Substanz Saquinavir als mögliche Sekundärmutation zugeordnet werden. Dass in den Jahren 1996 und 1997 bereits 25% der untersuchten Patienten Mutationen auf Position 82 aufwiesen, korreliert damit deutlich mit den vorangegangenen Markteinführungen von Indinavir und Ritonavir. In den darauffolgenden Jahren kam es allerdings zu einem kontinuierlichen Abfall der Mutationsprävalenz. 2001 fand sich bei fast 90% der untersuchten Proben der Wildtyp V. Dies läßt sich auf den Rückgang der Crixivan-Verordnungen wegen ausgeprägter Toxizitäten zurückführen.

Jahresbetrachtung AS-Position 90:

Die Mutationsrate der AS-Position 90 bewegte sich über die Jahre 1996 bis 2000 auf relativ gleichbleibendem Niveau. 2001 zeigte sich ein Anstieg des Wildtyps auf fast 90%. AS-Position 90 ist als Primärmutation für die Substanzen Saquinavir und Nelfinavir beschrieben. Durch die Einführung von Nelfinavir im März 1997 hätte man ein gehäuftes Auftreten von Mutationen auf dieser Position erwarten können. Diese Entwicklung konnte bei unserem Patientenkollektiv jedoch nicht beobachtet werden.

Für die Abnahme an Mutationen können ganz unterschiedliche Gründe angenommen werden: Aufgrund eines entsprechenden Ordnungsverhaltens der behandelnden Ärzte wurden innerhalb bestimmter Zeiträume einige Pls weniger verordnet. Oder aber es kommt durch effizientere Therapien seltener zum

Auftreten von Mutationen, bspw. durch eine verbesserte Wirksamkeit, z. B. durch den Einsatz von geboosterten Medikamenten (Kaletra[®], low-dose RTV) oder durch Mehrfach-Medikamenten-Kombinationen. Ein weiterer Grund kann in der Verbesserung der Patienten-Compliance durch Reduzierung der Tablettenmenge liegen. Eventuell wurden aber auch die Sequenzierungsdaten vermehrt während der ART-Pausen erhoben.

5.2 Mutationsentwicklungen

Aufgrund des breiten Einsatzes von antiretroviralen Medikamenten steigt die Zahl der Übertragungen von resistenten Viren. Dies zeigt sich in einem generellen Anstieg der Mutationsprävalenzen auch bei ART-naiven Patienten (*Little et al., 2002; Simon et al., 2002; Yerly et al., 2001; Duwe et al., 2001; Oette et al., 2007*).

Chaix et al. untersuchte in einer Prävalenz-Studie 249 ART-naive Patienten und fand bei 6% dieses Patientenkollektivs bereits Primärmutationen im Bereich der PR. Darüber hinaus konnte allerdings kein weiterer Anstieg der Mutationsrate in dem Beobachtungszeitraum von 1999–2000 dargestellt werden. Bei den Patienten zeigte sich zusätzlich eine geringere VL bei höherer CD4⁺-Zellzahl verglichen mit vorbehandelten Patienten, die ansonsten ähnliche Kriterien aufwiesen (*Chaix et al., 2003*). Die Entwicklung dieser klinischen Parameter deutet auf eine durch die Resistenzmutationen induzierte Reduktion der viralen Fitness hin (*Martinez-Picado et al., 1999; Mammano et al., 2000*).

Studien in Italien zeigten bei frisch infizierten Patienten eine Mutationsprävalenz in der PR von 5,9% (*Violin et al., 2002*) und unterstreichen damit die Ergebnisse der vorgenannten französischen Untersuchung.

Die Prävalenz der primären HIV-Medikamentenresistenz wurde ebenfalls in einer sechsjährigen Studie in Nordrhein-Westfalen bei chronisch Infizierten untersucht und betrug rund 10%. In den meisten Fällen wurden NRTI-assoziierte Mutationen

gefunden; 2,4% wiesen PI-assoziierte Resistenzen auf. Risikofaktoren für eine Primärresistenz konnten nicht identifiziert werden (*Oette et al., 2007*).

Bei Untersuchungen der I. CO N. A. Study Group in Italien fanden sich bei 78,1% der untersuchten langzeitinfizierten, nicht vortherapierten Patienten eine oder mehrere Mutationen. Ein Auftreten von Mutationen auf mit Primärmutationen assoziierten AS-Positionen zeigte sich jedoch nur bei 1,4% der Patienten. Diese Ergebnisse zeigen ein eher geringes Auftreten von Resistenzmutationen bei medikamenten-naiven Patienten, im Gegensatz zur Prävalenz von Sekundärmutationen (*Kijak et al., 2002; Perno et al., 2002*).

Studien von Tamalet et al. machen außerdem deutlich, dass die Mutationsprävalenz mit der Substanzklasse variiert. In einer Untersuchung mit 4442 Patienten zeigten 78,3% Resistenzmutationen für NRTIs, hingegen nur 38,9% für NNRTIs und 47% für PIs. Die hohe Mutationsrate bei den NRTIs könnte in einer suboptimalen Monotherapie begründet sein, wie sie zu Beginn der ART häufig eingesetzt wurde. Ebenso wird deutlich, dass vorbehandelte Patienten eine höhere Mutationsprävalenz aufzeigen (*Tamalet et al., 2003*).

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die Prävalenz sowohl der Primär- als auch der Sekundärmutationen unter ART, im Vergleich zu ART-naiven Patienten, deutlich höher ist. Die Auswertung der Frankfurter HIV-Resistenzdatenbank bestätigte diese Ergebnisse. Darüber hinaus zeigte sich eine generell geringe Mutationsprävalenz der PR, vor allem im Bereich der Primärmutationen. Dennoch zeigen zahlreiche Studien mit genotypischen Resistenztestungen ein Ansteigen von mutierten Viruspopulationen bei zuvor unbehandelten Patienten mit daraus resultierenden primären HIV-Medikamentenresistenzen. Diese Ergebnisse lassen Resistenztestungen vor Beginn einer ART sinnvoll erscheinen.

5.3 Low-Level-Auswertung

Bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten wiesen 33 Patienten unseres Kollektivs zum Zeitpunkt der Sequenzierung eine VL von <1.000 Kopien pro ml Blut auf. Daraus ergab sich die Fragestellung, inwieweit bereits eine geringe Menge an Virusmaterial ausreicht, um bei Genotypisierungen aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Die Genotypisierungsergebnisse konnten hier eine deutliche Korrelation zwischen den gefundenen Mutationen und den vorangegangenen PI-Therapien zeigen. Bei der Betrachtung mehrerer Genotypisierungsdaten eines Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte sich, dass Mutationen nach Absetzen des jeweiligen PIs noch einige Wochen bis Monate bestehen bleiben, bis es zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Selektionierung des Wildtyps kommt (*Hance et al., 2001*).

Patient 1 (SIWA):

Patient SIWA wird ausführlich im nachfolgenden Kapitel ‚Patientenverläufe‘ erläutert.

Patient 2 (MAMA):

Bei diesem Patienten zeigte sich die Ausbildung der typischen NFV-Mutation D30N nach vorangegangener Nelfinavir-Therapie. Die 46-Mutation, als Sekundärmutation von NFV, führte zu einer Kreuzresistenz für IDV. Auch dieser Patient wird ausführlich im Kapitel ‚Patientverläufe‘ diskutiert.

Bei Patient 3 (NOBA) erfolgte die Genotypisierung während der PI-Therapie und zeigte den direkten Zusammenhang zwischen den detektierten Mutationen auf den Positionen 46 und 84 und der PI-Therapie mit IDV und RTV. Für Patient 4 (MIME) erfolgte die Genotypisierung 3 Jahre nach Absetzen von INV, FOV und NFV, wobei die Therapie mit IDV und RTV weitergeführt wurde. NFV wurde nur drei Monate eingenommen. Die Ausbildung der L90M-Mutation könnte durch alle der von diesem Patienten eingenommenen Medikamente hervorgerufen worden sein. Im

Fall von Patient 5 (MEBI) zeigte sich nach Nelfinavir-Einnahme die typische D30N-Mutation. Trotz dieser Resistenz-Mutation (D30N) fanden sich bei diesem Patienten dennoch eine konstant niedrige VL bei stabiler CD4⁺-Zellzahl. Bei Patient 6 (HOFR) wurden alle PIs ca. 2,5 Jahre vor dem Zeitpunkt der Genotypisierung abgesetzt. Die noch vorhandene Mischung D30D/N läßt allerdings darauf schließen, dass es unter der NFV-Therapie auch hier zur Ausbildung der D30N-Mutation gekommen ist. Bei Patient 7 (MIBR) wurden die beiden PIs IDV und RTV 1,5 Jahre vor der Genotypisierung abgesetzt. Dennoch kam es nicht zur Rückbildung der Resistenzmutation auf Pos. 82. Bei diesem Patienten zeigte der Verlauf eine über 4 Jahre hinweg niedrige VL bei hoher CD4⁺-Zellzahl. Dies läßt auf eine gute Suppression der Virusreplikation schließen. Dennoch kam es zur Ausbildung von Primärmutationen, die aber auf den klinischen Verlauf keinen großen Einfluß zu haben schienen. Dies könnte in der zusätzlichen NRTI- und NNRTI-Therapie begründet sein. Auch bei Patient 8 (THZE) zeigte sich nach NFV-Therapie die typische D30N-Mutation. Die Genotypisierung erfolgte unter NFV-Therapie.

Patient STSC nimmt bei dieser Betrachtung eine Sonderstellung ein. Bei der Genotypisierung zeigte sich eine Primärmutation auf Pos. 82, die vorangegangene PI-Medikation läßt diese allerdings als Sekundärmutation interpretieren. Trotz zweijähriger NFV-Therapie kam es bei diesem Patienten nur zur Ausbildung von Sekundärmutationen (36, 71, 82). Allerdings bildet die Mutation auf AS-Pos. 82 aufgrund von Kreuzresistenzen eine Primärresistenz für die Substanzen IDV und RTV.

5.3.1 Resistenz-Entwicklung unter Nelfinavir-Therapie

Bei dem Patientenkollektiv der Low-Level-Patienten lassen sich nachfolgende Aussagen zur Thematik der Nelfinavir-Resistenz treffen:

Bei vier Patienten zeigte sich nach einer Nelfinavir-Therapie eine isolierte D30N-Mutation, bei bestehendem Wildtyp auf Position 90 (MAMA, MEBI, THZE, HOFR). Bei zwei der untersuchten Low-Level-Patienten kam es trotz gefundener Nelfinavir-

Resistenz durch eine D30N-Mutation nicht zu einem Therapieversagen (MEBI, THZE) im Hinblick auf die klinischen Parameter. Nur bei einem der untersuchten Low-Level-Patienten zeigte sich unter Nelfinavir-Therapie eine Mutation auf AS-Position 90. In der Vortherapie hatte dieser Patient neben Nelfinavir auch Invirase und Fortovase erhalten, die beide ebenfalls Mutationen auf Position 90 begünstigen. Daher kann die Mutation auf dieser Position nicht eindeutig Nelfinavir zugeschrieben werden (MIME). Bei einem Patienten (STSC) kam es auch nach 2-jähriger Nelfinavir-Therapie nicht zur Ausbildung von Primärmutationen.

Wie bereits unter 5.1.1 erläutert, scheint laut einer Untersuchung von Miller in 2001 die Tatsache, ob sich Resistenzmutationen unter Nelfinavir-Therapie auf AS-Position 30 oder auf Position 90 ausbilden, damit zusammenzuhängen, inwieweit Nelfinavir als Monotherapie oder im Rahmen einer Kombinationstherapie appliziert wird und um welchen Virus-Subtyp es sich handelt. Nelfinavir als Monotherapie führt verstärkt zur Ausbildung der D30N-Mutation. Sowohl in der Kombinationstherapie als auch im Rahmen von Vortherapien mit anderen antiretroviralen Medikamenten zeigt sich hier eher die Ausprägung der L90M-Mutation (*Miller, 2001*). Die Auswertung unseres Low-Level-Kollektivs konnte diesen Zusammenhang bestätigen, wobei keine Daten zum Subtyp vorlagen. Bei Patienten mit Nelfinavir als Monotherapie fand sich ausschließlich die D30N-Mutation, bei bestehendem Wildtyp auf Position 90. Mutationen auf AS-Position 90 fanden sich vermehrt bei Patienten mit Mehrfach-PI-Therapie bzw. umfangreichen Vortherapien.

Die Auswertungen der Low-Level-Patienten konnten zeigen, dass Sequenzierungen auch mit geringem Virusmaterial durchführbar sind und aussagefähige Ergebnisse erzielen. Die gefundenen Mutationen passten sowohl zu den entsprechenden Vortherapien als auch zu den klinischen Parametern, wie VL- und CD4⁺-Entwicklung, die sich in der Folgezeit darstellten.

Die Genotypisierung ist also auch bei Patienten mit einer Virusbeladung von ≤ 1.000 Viruskopien pro ml Blut eine geeignete Methode, um Fragestellungen nach Therapieverläufen, Mutationen und Resistenzentwicklungen zu beantworten.

5.3.2 Patientenverläufe

Ziel dieser Patientenauswertungen war es festzustellen, inwieweit eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf und den Ergebnissen der Genotypisierungen gezeigt werden kann.

Patient 1 (SIWA):

Bei dem ersten Patientenverlauf handelt es sich um einen massiv vorbehandelten Patienten. In den Jahren vor der ersten Genotypisierung im November 1999 beinhaltete seine PI-Therapie die Substanzen Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir und Ritonavir.

Der graphische Verlauf von VL und CD4⁺-Zellzahl zeigt ein reziprokes Verhalten dieser beiden klinischen Parameter zueinander; ein Anstieg der VL resultiert, mit geringer zeitlicher Verzögerung, in einem Abfall der CD4⁺-Zellzahl. Konnte im Rahmen einer suffizienten Therapie die Virusreplikation reduziert werden, spiegelte sich dies nach kurzer Zeit in einem leichten Anstieg der CD4⁺-Zellzahl wider. Sehr deutlich wird dieser Zusammenhang an dem Plateau der VL-Linie während einer ART-Pause zwischen Juli 1998 und März 1999 bei Werten von 1.000.000 Viren/ml Blut und dem dazugehörigen Zusammenbruch des Immunsystems auf Werte von nur noch 2 bzw. 3 CD4⁺-Zellen. Ein erneuter Therapieversuch im März 1999 mit Nelfinavir, Ritonavir und Indinavir führte rasch zu einer klinischen Verbesserung. Es kam zu einem Abfall der VL um 3 log₁₀-Stufen mit damit verbundenem Anstieg der CD4⁺-Zellen auf über 20 pro µl Blut. Aufgrund einer Laktatazidose mußte die Therapie am 01.07.1999 unterbrochen werden. Die darauffolgende Therapiepause führte innerhalb weniger Wochen zu einem erneuten VL-Anstieg um 2 log₁₀-Stufen. Zum Zeitpunkt der ersten Sequenzierung im November 1999, ebenso wie bei den Sequenzierungen im Dezember 1999 und Januar 2000, erhielt der Patient als Medikation ausschließlich RTIs. Die Sequenzierungsergebnisse der PR zeigten in diesen Zeiträumen jeweils nur die L63P-Mutataion, was darauf hindeutet, dass es

zu einer Rückbildung etwaiger Mutationen während der PI-Therapiepause gekommen sein muß. Kommt es durch das Absetzen der ART zu einer Reduktion des Selektionsdrucks, resultiert dies häufig in einer Verschiebung der Viruspopulation in Richtung Wildtyp (*Izopet et al., 2002*).

Da die ausschließliche RTI-Therapie zu keiner akzeptablen Verbesserung der klinischen Parameter führte, wurde die Therapie im Januar 2000 erneut um die PIs Indinavir und Ritonavir ergänzt. Dies führte erneut zu einem raschen Abfall der VL um 2 log₁₀-Stufen und parallel hierzu zu einem leichtem Anstieg der CD4⁺-Zellzahl. Dieser Therapiewechsel führte jedoch bereits nach zwei Monaten zur Ausbildung von zahlreichen Mutationen, die sich bei der Sequenzierung im März 2000 auf den Positionen 20, 46, 63, 71, 84 und 90 darstellten. Das Auftreten dieser für Indinavir, Ritonavir, Saquinavir und Nelfinavir typischen Mutationen kann als Re-selektionierung bereits früherer Mutationen durch den erneuten Selektionsdruck interpretiert werden. Dies bedeutete für den Patienten das Vorhandensein von Resistenzen für alle bis zu diesem Zeitpunkt zugelassenen PIs.

Eine erneute ART-Pause von Mai bis August 2000 führte auch hier wieder zu einem Anstieg der VL um 2 log₁₀-Stufen, verbunden mit einer Rückbildung aller Mutationen, bis auf die L63P-Mutation, wie eine Sequenzierung im August zeigte. Zeitgleich wurde ein neuer Therapieversuch unternommen; zusätzlich zu drei RTIs erhielt der Patient Fortovase sowie im Rahmen einer klinischen Studie das kurz vor der Zulassung stehende Kaletra[®]. Diese neue Therapie führte innerhalb von zwei Wochen zu einer VL-Reduktion um 2 log₁₀-Stufen und nach weiteren drei Monaten um nochmals 1 log₁₀-Stufe. Die Anzahl der CD4⁺-Zellen stieg kontinuierlich an, bis zu einem Höchststand von 95 Zellen im Mai 2001. Genotypisierungen zeigten in diesem Zeitraum wieder lediglich die L63P-Mutation (August und Oktober 2000) sowie zusätzlich eine Mischung auf Position 71 im November 2000. Die Kombination der Protease-Hemmer Kaletra[®] und Fortovase führte bei diesem Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Parameter, was sich genotypisch darin bestätigte, dass es in einem Zeitraum von 9 Monaten zu keiner Ausbildung von Primärmutationen kam.

Aufgrund einer symptomatischen Hyperlaktatämie im April 2001 wurden die RTI-Medikamente abgesetzt und die PI-Therapie mit Kaletra[®] und Fortovase beibehalten. Ende Mai kam es dann allerdings erneut zu einem Anstieg der VL um 2 log₁₀-Stufen. Eine Sequenzierung zu diesem Zeitpunkt zeigte eine Reselektionierung aller bereits im März des vergangenen Jahres vorhandenen Mutationen, mit einer zusätzlichen Mutation auf Position 10. In den darauffolgenden Wochen kam es zu einem weiteren Ansteigen der VL um eine weitere log₁₀-Stufe, wobei die CD4⁺-Zellzahl zunächst noch konstant blieb. Eine Sequenzierung im Juli 2001 zeigte die identischen Mutationen wie bei der Untersuchung zuvor. Aufgrund der Mutationsvielfalt wurde erneut eine ART-Pause eingelegt, die zu einem weiteren Anstieg der VL führte. Der Abfall der CD4⁺-Zellen trat mit einer zeitlichen Verzögerung von einigen Wochen ein, war aber dramatisch. Im September war die CD4⁺-Zellzahl wiederum nur noch einstellig und die VL auf 750.000 angestiegen. Sequenzierungen im September und Oktober zeigten die erwartete, fast vollständige Rückbildung der Mutationen. Im November wurde ein weiterer Therapieversuch mit Kaletra[®] und Fortovase unternommen. Dieser führte zunächst erfolgreich zu einer Reduktion der Virusbeladung um 2 log₁₀-Stufen; dieser Erfolg konnte aber nur 6 Wochen gehalten werden. Den Grund für das erneute Therapieversagen machte die Sequenzierung im Januar 2002 deutlich. Es fanden sich Mutationen auf fast allen AS-Positionen. Kaletra[®] versagte aufgrund der Kreuzresistenzen. Eine erneute Therapiepause führte zwar wiederum zu einer Rückbildung der Mutationen, wie die Sequenzierung im April 2002 zeigte, es kam aber dennoch zu einem weiteren Anstieg der Virusbeladung und einem Abfall der CD4⁺-Zellen auf nur noch 3 Zellen/ μ l Blut.

Die Betrachtung dieses Patienten konnte die Aussagefähigkeit der Ergebnisse von Genotypisierungen bei hoher VL (>1000 Kopien/ml Blut) im Vergleich zu Untersuchungen mit nur geringem Virenmaterial (<1000 Kopien/ml Blut) überprüfen. Die Ergebnisse der Genotypisierung im Oktober 2000 bei einer VL von <1000 korrelierten exakt mit der dazugehörigen Therapie bzw. Therapiepause und

erschieden auch in Bezug auf die vorangegangenen sowie nachfolgenden Sequenzierungsergebnisse stimmig. Darüber hinaus zeigte sich deutlich die Ausbildung bzw. die Reselektionierung von Mutationen unter Selektionsdruck sowie deren Rückbildung unter ART-Pause.

Patient 2 (MAMA):

Patient 2 erhielt ab dem 01.02.1999 Nelfinavir als einzigen PI ohne eine ART-Pause während unseres Auswertungszeitraumes. Zuvor wurde er ausschliesslich mit RTIs behandelt. In dieser Zeit zeigten sich große Schwankungen sowohl bei der VL als auch bei der Anzahl der CD4⁺-Zellen. Die Aufnahme eines zusätzlichen PIs in die Therapie erfolgte nach einer Therapiepause, die von Oktober 1998 bis zum 31.01.1999 andauerte. In diesem Zeitraum wurde die höchste VL gemessen und auch die CD4⁺-Zellen erreichten ihren Tiefstwert. Die erneute Aufnahme einer ART am 01.02.1999 führte zu einem raschen Abfall der VL und zu einer Erholung der CD4⁺-Zellen und macht den Erfolg einer ART deutlich. Bei der ersten Sequenzierung im Februar 2000 zeigte sich auf Position 30 die als Primärmutation für Nelfinavir bekannte D30N-Mutation. Auf den Positionen 46, 71, 77 und 88 fanden sich zusätzlich noch Sekundärmutationen für Nelfinavir. Die Mutation auf AS-Position 46 führte darüber hinaus zu einer Kreuzresistenz für Indinavir. Dennoch wurde die Therapie beibehalten und obwohl aufgrund der Nelfinavir-Resistenz ein vollständiges Therapieversagen hätte erwartet werden müssen, war dies nicht der Fall. Es zeigte sich zwar eine Low-level-Replikation, die VL blieb jedoch konstant niedrig, wenn auch mit leichten Schwankungen, zwischen 6.400 kurz nach Therapiebeginn und 40 Viruskopien pro ml Blut; die CD4⁺-Zellzahl bewegte sich zwischen 339, ebenfalls kurz nach Therapiebeginn, und 582 Zellen pro µl Blut. Die zweite Sequenzierung im September 2001 zeigte eine fast identische Verteilung der Mutationen. Eine mögliche Erklärung für den Mischtyp D30D/N könnte eine Kontamination des Serums mit zellulärer viraler DNA unter der Blutentnahme sein. Zum Zeitpunkt dieser Sequenzierung hatte der Patient eine VL von 630 Viren/ml Blut. Bei dieser relativ geringen Anzahl von Viruskopien könnte eine Kontamination

mit zellulärer viraler DNA, die den Wildtyp enthält, bereits zu dem Bild des Mischtyps führen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten des Mischtyps bieten Schwankungen in der Compliance. Das Ausbleiben eines Therapieversagens trotz der zahlreichen Resistenzmutationen könnte darauf zurückzuführen sein, dass eben diese zu einer Schwächung der viralen Fitness mit nachfolgender Reduzierung der Replikation geführt haben. Eine weitere Erklärung könnte ein gutes Ansprechen der RTIs sein mit damit verbundener Kompensation des Wirkverlustes von Nelfinavir. Allerdings hatte sich zuvor gezeigt, dass erst die Kombination von RTIs mit einem PI zu einer andauernden Reduzierung der VL führte.

Die Untersuchung dieser beiden Patientenverläufe zeigte sehr deutlich die reziproke Korrelation zwischen der VL und der CD4⁺-Zellzahl. Auch spiegelte sich in den Ergebnissen der Genotypisierungen der jeweilige klinische Verlauf wider. Die Rückbildung von Mutationen während der Therapiepausen konnte ebenso wie die Reselektionierung von Mutationen unter erneutem Selektionsdruck dargestellt werden.

Weitere Aussagen über den prädiktiven Wert von Genotypisierungen ergab die LOPSAQ-Studie, eine Doppel-PI-Studie aus Frankfurt. Hierbei wurden 121 massiv vortherapierte Patienten untersucht, die multiple RTI-Resistenzen oder toxische Nebenwirkungen nach RTI-Therapie aufwiesen. Diese Patienten erhielten 24 Wochen eine Doppel-PI-Therapie, bestehend aus Lopinavir/r und Saquinavir. Die Untersuchung ergab 77 Responder und 38 Non-Responder, wobei der Unterschied zwischen der Gruppe der Responder zu den Non-Respondern in der CD4⁺-Zellzahl zu Beginn der Studie sowie in der Anzahl der PI-Mutationen unter der vorangegangenen Therapie lag. Die Responder zeigten im Median eine CD4⁺-Zellzahl von 196/ μ l Blut bei nur 2 PI-Mutationen. Die Gruppe der Non-Responder wies hingegen im Median nur 66 CD4⁺-Zellen/ μ l Blut, jedoch 8 PI-Mutationen auf. Diese Studie konnte zeigen, dass der Ausgangswert an CD4⁺-Zellen sowie die Anzahl der vorbestehenden Mutationen von entscheidender Bedeutung für das Ansprechen einer ART sind und machen somit den prädiktiven Wert von Genotypisierungen deutlich (*Staszewski et al., 2004*).

5.4 Veränderungen der Mutationen

Bei dieser Auswertung lag der Fokus auf Veränderungen in der Mutationsprävalenz, die sich während Therapiepausen und nachfolgender erneuter Medikation ergeben. Welche Mutationen bildeten sich während einer Therapiepause vollständig zurück, bei welchen erfolgte ein Wechsel zur Mischung Wildtyp/Mutation, und welche Mutationen traten nach erneuter Therapie rasch wieder auf bzw. welche verschwanden dauerhaft?

Bei 28 Patienten unseres Kollektivs lagen ausreichende Sequenzierungsdaten vor, die jeweils die Zeiträume eines beginnenden Therapieversagens, während der Therapiepause sowie nach erneuter Behandlung beinhalteten.

Bei 2 von 10 Patienten bildeten sich bestehenden Mutationen auf der AS-Position 10 während der Therapiepause zurück, wurden allerdings nach erneutem Therapiebeginn wieder selektioniert. Bei einem Patienten kam es zu einem Wechsel der L10I-Mutation zur L10F-Mutation. Auch auf der Position 20 bildeten sich 3 von 4 Patienten die Mutationen zurück, die allerdings nach erneuter Medikation reselektioniert wurden. Auf den Positionen 24, 32, 47, 48 sowie 84 zeigte sich bei allen untersuchten Patienten während der Therapiepause der Wildtyp. Auch hier kam es nach erneutem Therapiebeginn bei allen Patienten zu einer Resektionierung der Mutationen. Die Therapiepause als Methode zur langfristigen Reduktion von Mutationen fand hierbei keine Bestätigung.

Bei einem Patienten zeigte sich auf Position 16 die Mutation G16A. Diese verschwand während der Pause und trat auch nicht erneut wieder auf. Da diese Mutation zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Resistenzen assoziiert ist, dürfte der Patient hiervon kaum profitiert haben.

Die Mutation L33F zeigte sich bei 2 Patienten im Rahmen einer geboosterten Amprenavir-Therapie. Diese verschwanden unter der Therapiepause und wurden nur bei einem Patienten erneut reselektioniert. Diese Mutation wird in der aktuellen Literatur im Zusammenhang mit einer Therapie mit Ritonavir geboosterten

Substanzen, wie Amprenavir, Lopinavir und Tipranavir, beschrieben (*Croom et al., 2005; Marcelin et al., 2004; Svicher et al., 2005; Mo et al., 2005*).

Die AS-Position 60 wird in der Literatur nicht mit Resistenzen assoziiert. Bei einem der untersuchten Patienten kam es allerdings während einer Therapiepause zur Rückbildung dieser Mutation und zur nachfolgenden Reselektionierung nach erneuter Therapie.

Bei den AS-Positionen 63 und 71 der Protease handelt es sich zum Teil auch um Positionen, die den natürlichen Polymorphismus einschließen. Mutationen auf diesen Positionen stellen keinen Nachteil für die Replikationsfähigkeit des Virus dar und blieben daher in Therapiepausen häufig bestehen.

Besonders hervorzuheben sind die unter Lopinavir neu aufgetretenen Mutationen:

- ⇒ I 47 I/V
- ⇒ I 54 V
- ⇒ I 84 A

Die Ergebnisse dieser Untersuchung decken sich mit denen der Low-Level-Auswertung.

Unter Therapiepause kam es zur Ausbildung der Mutationen G16E und G73I. Wie unter 5.1.2 erläutert, handelt es sich hierbei um Sekundärmutationen, deren Konsequenz erst im Rahmen einer erneuten antiretroviralen Therapie zu beurteilen ist.

Therapiepausen werden beim Auftreten von toxischen Nebenwirkungen eingesetzt, aber auch bei Therapieversagen aufgrund von Multiresistenzen. Obwohl Therapiepausen in den meisten Fällen sowohl zu einem Anstieg der VL als auch zu einem Abfall der CD4⁺-Zellen führen, bieten sie dennoch die Chance, multiresistente Viruspopulationen zu reduzieren (*Youle et al., 2000; Devereux et al., 1999; Delaugerre et al., 2001; Deeks et al., 2001, Miller et al., 2000, Tebas et al., 2002*).

Eine Studie in den USA von Lawrence et al. untersuchte multiresistente Patienten auf Veränderungen von klinischen Parametern unter Therapiepause. Bei der ersten Studiengruppe wurde eine 16-wöchige Therapiepause eingelegt, an deren Ende wieder eine optimale Therapie erfolgte. Die Kontrollgruppe wurde von Beginn an auf eine ihren Mutationen angepaßte Therapie eingestellt. Bei 64% der Patienten aus der Studiengruppe verschwanden während der ersten vier Monate die Mutationen teilweise oder vollständig, und es kam zur Reselektionierung des Wildtyps. Hiermit verbunden war allerdings auch ein Anstieg der VL verbunden mit einem Abfall der CD4⁺-Zellzahl. Auch nach erneuter Therapie im Anschluß an die 16-wöchige ART-Pause blieb die CD4⁺-Zellzahl in der Studiengruppe unter den Werten der Kontrollgruppe. Die Virusbeladung näherte sich in beiden Gruppen nach etwa 12 Monaten an. Die Progression der Erkrankung war in der Studiengruppe signifikant erhöht. Bei dieser Patientengruppe konnten keine immunologischen oder viologischen Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Lebensqualität war in beiden Gruppen gleich. Insgesamt wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppe schlechter beurteilt als die der Kontrollgruppe. 16 Wochen Therapiepause wurden als ausreichend beurteilt, den größtmöglichen Switch von resistenten Viren zum Wildtyp zu erreichen, bei gleichzeitiger Risikoreduzierung eines ausgeprägten Abfalls der CD4⁺-Zellzahl (Lawrence et al., 2003). Dieser Zeitraum entspricht auch den Daten einer Studie von Deeks et al., die die Reversion zum Wildtyp innerhalb von 2 – 15 Wochen nach Unterbrechung einer ART beschreibt (Deeks et al., 2003).

Die SMART Study Group, Harlem Hospital Center and Columbia University, New York, verglich eine kontinuierliche antiretrovirale Behandlung mit einer an der CD4⁺-Zellzahl orientierten, episodischen ART. Hierbei ergab sich ein signifikant höheres Risiko für opportunistische Erkrankungen oder sogar den Tod bei der Gruppe der nur episodisch behandelten HIV-Patienten (SMART Study Group, 2006).

Nach wie vor wird die Sinnhaftigkeit von Therapiepausen kontrovers diskutiert. Studien von Katlama et al. beschreiben einen Benefit, zahlreiche andere Unter-

suchungen stehen dieser Art des Therapieregimes jedoch äußerst kritisch gegenüber (*Katlama et al., 2004; Delaugerre et al., 2001; Ghosn et al., 2005*).

Die Analyse der Frankfurter Low-level-Daten hinsichtlich dieser Fragestellung ergab, dass es sich bei der Rückbildung der Mutationen während der Therapiepausen nur um einen temporären Erfolg handelte, der darüber hinaus noch mit einer Verschlechterung der klinischen Parameter verbunden war. Bei allen Patienten, bei denen es nach erneutem Therapiebeginn zu einer Reselektionierung der ursprünglichen Mutationen kam, war dieses mit einem erneuten Therapieversagen verbunden. Darüber hinaus zeigte sich, dass auch bei einem bereits vielfach mutierten HIV-Genom zusätzliche Mutationen selektioniert werden können. Zusammenfassend gesehen, konnte die STI zu keiner langfristigen Reduktion der Resistenzen führen. ART-Pausen als „neue Therapie-Möglichkeit“ bei Therapieversagen scheinen nur dann den erhofften Erfolg zu bringen, wenn die erneute Therapie mit Medikamenten erfolgt, die keine der alten Mutationen reselektionieren.

5.5 Schlußbemerkung

Zahlreiche Mutationen im HIV-Genom können zum einen aufgrund nachfolgend eingeschränkter viraler Fitness und somit Reduktion der Replikationsfähigkeit für den Virusträger von Vorteil sein; in der Mehrzahl der untersuchten Fälle führen sie jedoch zu einem Therapieversagen und sind daher für den Patienten und dessen Behandlung als äußerst problematisch anzusehen.

Die Transmission von resistenten Viren scheint sich in Zukunft zu einem weiteren Problem in der Therapie der HIV-Infektion zu entwickeln. Untersuchungen der McGill University in Kanada zeigten bei frisch infizierten Patienten, die zwischen 1997 und 1999 sequenziert wurden, bereits ein Vorkommen von 15% an Primärmutationen (*Brenner et al., 2000*). Weitere Studien fanden bei 78% der HIV-Infizierten Resistenzmutationen, die eine Resistenz gegen wenigstens ein anti-retrovirales Medikament aufwiesen (*Richman et al., 2001; Susman et al., 2002*).

Die Fortschritte der vergangenen Jahre in der Entwicklung neuer antiretroviraler Substanzen zur Therapie der HIV-Infektion sind unumstritten. Dennoch sind HIV und AIDS trotz der zahlreichen zugelassenen Medikamente und der derzeitigen Empfehlung von Kombinationstherapien und Boosterung auch heute nach wie vor nicht heilbar. Solange die Forschungen an der Entwicklung eines Impfstoffes noch nicht abgeschlossen sind, muß ein Schwerpunkt auch in Zukunft in der Infektionsprävention zu sehen sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Erstellung und Auswertung der Frankfurter HIV-Resistenzdatenbank dient der Analyse von Prävalenzen von Primär- und Sekundärmutationen im HIV-Genom für die spezifischen antiretroviralen Medikamente sowie der Untersuchung von Korrelationen von Punktmutationen in der Protease mit klinischen Parametern.

Die hier vorgestellte allgemeine Datenbankauswertung bestätigte die in der Literatur beschriebene nur geringe Mutationsprävalenz in der Protease, sowohl im Bereich der Primärmutationen (AS-Pos. 30, 46, 48, 50, 82, 84 und 90) also auch der Sekundärmutationen. Ebenso zeigte sich, dass die Ausbildung von Mutationen unter Selektionsdruck durch eine antiretrovirale Therapie deutlich über der von ART-naiven Patienten liegt.

Die Untersuchung von Patienten mit niedriger Virusbeladung (Low-level-Patienten) konnte zeigen, dass auch bei Sequenzierungen mit geringem Virusmaterial aussagefähige Ergebnisse zu erzielen sind. Die Mutationen passten sowohl zu den entsprechenden Vortherapien als auch zu den klinischen Parametern, wie Viruslast und CD4⁺-Zellzahl. Das Verfahren der Genotypisierung stellt daher auch für Patienten mit einer niedrigen Viruslast (< 1000 Kopien/ml Blut) eine geeignete Methode dar, um Fragestellungen nach Mutationen, Therapieverläufen und Resistenzentwicklungen zu beantworten. Die Analyse von Patientenverläufen aus dem Low-level-Kollektiv bestätigte die reziproke Korrelation zwischen Viruslast und CD4⁺-Zellzahl. Auch hier spiegelte sich in den Ergebnissen der Genotypisierungen der jeweilige klinische Verlauf wider.

Die Auswertung von Mutationsveränderungen unter Therapiewechseln bzw. ART-Pausen lässt den Erfolg von Therapiepausen zur Rückbildung von Mutationen kritisch betrachten. Bei dem Frankfurter Kollektiv kam es bei allen Patienten nach erneutem Therapiebeginn zu einer Reselektionierung der ursprünglichen Mutationen und war mit einem erneuten Therapieversagen verbunden. Die STI konnte hier zu keiner langfristigen Reduktion der Resistenzen führen. Ebenso wurde

deutlich, dass auch bei einem bereits vielfach mutierten HIV-Genom zusätzliche Mutationen selektioniert werden können.

Insgesamt gesehen zeigen die Auswertungen aller hier zugrunde liegenden Daten, dass die Genotypisierung eine unverzichtbare diagnostische Methode darstellt, ohne die für den Patienten eine effiziente und optimale medikamentöse Therapie nicht gewährleistet werden kann.

6.1 ABSTRACT

The establishment and evaluation of the Frankfurt HIV-Resistance Database serves as the basis for analyses of the prevalence of primary and secondary mutations in the HIV genome with respect to specific anti-retroviral medication as well as for correlations between point mutations in the protease and clinical parameters.

The general evaluation of the database confirmed the low mutation prevalence of the protease as described in the literature referring both to primary (amino acids 30, 46, 48, 50, 82, 84 and 90) and secondary mutations. Furthermore, it became evident that the formation of mutations under selection pressure due to an anti-retroviral therapy significantly exceeds that of ART-naive patients.

Examining patients with a low viral load (low-level-patients) showed that valid results may be obtained by genotyping. The mutations correlated with the respective former therapies as well as the clinical parameters such as viral load and CD4⁺ cell count. Therefore, the method of genotyping proved to be appropriate also for patients with a low viral load (<1000 copies/ml blood) to analyze mutations, courses of therapy and formation and development of resistance.

The analysis of clinical parameters in different low level-patients confirmed the reciprocal correlation between virus load and CD4⁺ cell count. Additionally, the results of genotyping reflected the respective clinical course. The evaluation of mutations during therapy changes or rather ART interruptions led to a critical assessment of the success of this strategy. Within the Frankfurt data pool a reselection of the original mutations occurred in all patients following renewed onset of therapy and subsequent therapy failure. Therapy interruption could not lead to a long-term reduction of high-level drug resistance. On the contrary, this was coupled with exacerbation of the clinical parameters. Finally, it could be demonstrated that an already multiply mutated HIV genome could select for

even more mutations.

Summarizing, the evaluation of all applicable data shows that genotyping resistance tests for HIV-1 is an indispensable diagnostic method to ensure an effective and optimal antiretroviral medication.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adje C, Cheingsong R, Roels TH, Maurice C, Djomond G, Verbiest W, Hertogs K, Larder B, Monga B, Peeters M, Eholie S, Bissagene E, Coulibaly M, Respass R, Wiktor S, Chorba T, Nkengasong JN: High Prevalence of Genotypic and Phenotypic HIV-1 Drug-Resistant Strains Among Patients Receiving Antiretroviral Therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire. *JAIDS* 2001; 26(5): 501-506

Ammaranoud P, Cunningham P, Oelrichs R, Suzuki K, Harris C, Leas L, Grulich A, Cooper A, Kelleher AD: Rates transmission of antiretroviral drug resistance strains of HIV-1. *J Clin Virol.* 2002; 26(2): 153-161

Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W: Pattern of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 33(3): 336-342

Arribas JR, Pulido F, Delgado R, Lorenzo A, Miralles P, Arranz A, Gonzales-Garcia JJ, Cepeda C, Hervas R, Pano JR, Gaya F, Garcas A, Montes ML, Costa JR, Pena JM: Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomised, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 ; 40(3) : 280-287

Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, Manzin A, Giacca M, Ancarani F, Scalise G, Valardo PE, Clementi M: Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and patients with AIDS. *J Virol* 1992; 66(12): 7328-7335

Baker R: Roche investigators say Invirase does not cause cross-resistance to other protease inhibitors. *Beta* 1995; 5

Bardsley-Elliot A, Plosker GL: Nelfinavir: an update on its use in HIV infection. *Drugs* 2000; 59(3): 581-620

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L: Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871

Blankson JN: Primary HIV-1 infection: to treat or not to treat? *AIDS Read.* 2005; 15(5): 245-246, 249-251

Boden D, Markowitz M: Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 24(11): 2775-2783

Brenner B, Wainberg MA, Salomon H, Rouleau D, Dascal A, Spira B, Sekaly RP, Conway B, Routy JP: Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV-1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16(4): 429-434

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): A survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17(7): 1063-1069

Cane PA, De Ruiter A, Rice P, Wiselka M, Fox R, Pillay D: Resistance-associated mutations in the human immunodeficiency virus type 1 subtype c protease gene from treated and untreated patients in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(7): 2652-2654

Carrillo A, Stewart KD, Sham HL, Norbeck DW, Kohlbrenner WE, Leonard JM, Kempf DJ, Molla A: In vitro selection and characterization of human immunodeficiency

virus type 1 variants with increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor. *Journal of Virology* 1998; 72: 7532-7541

Centers for Disease Control: Karposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men – New York City and California. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1981a; 30: 305-308

Centers for Disease Control: Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1981b; 30: 250-252

Centers for Disease Control: Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1982; 31: 507-513

Centers for Disease Control: 1993 revised classification systems for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1992; 41: 1-19

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L: Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-346

Clotet B, Ruiz L, Martinez-Picado J, Negredo E, Hill A, Popsescu M: Prevalence of HIV protease mutations on failure of nelfinavir-containing HAART: a retrospective analysis of four clinical studies and two observational cohorts. *HIV Clinical Trials*. 2002; 3(4): 316-323

Cohen CJ: Ritonavir-boosted protease inhibitors, Part 1: strategies for balancing efficacy with effects on lipids. *AIDS Readings*. 2005; 15(9): 462-465, 470, 474, 477

Cohen C, Nieto-Cisneros L, Zala C, Fessel WJ, Gonzalez-Garcia J, Gladysz A, McGovern R, Adler E, McLaren C: Comparison of atazanavir with lopinavir/ritonavir in patients with prior protease inhibitor failure: a randomized multinational trial. *Curr Med Res Opin.* 2005; 21(10): 1683-1692

Condra JH, Holder DJ, Schleif WA, Blahy OM, Danovich RM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Laird D, Yang T, Chodakewitz JA, Deutsch PJ, Leavitt RY, Massari FE, Emini EA: Genetic correlates in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Journal of Virology* 1996; 70: 8270-8276

Condra JH, Schleif WA, Blany OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Titus D, Yang T, Teppler H, Squires KE, Deutsch PJ, Emin EA: In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995; 374: 569-571

Croom KF, Keam SJ: Tipranavir: a ritonavir-boosted protease inhibitor. *Drugs* 2005; 65(12): 1669-1677

D'Aquila RT, Schapiro JM, Brun-Vézinet, F, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Grant RM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Shafer RW, Richman, DD: Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Special Contribution – Drug Resistance Mutations* 2002; 10(5): 21-25

Deeks SG, Grant RM, Wrin T: Persistence of drug-resistant HIV-1 after a structured treatment interruption and its impact on treatment response. *AIDS* 2003; 17: 361-370

Deeks SG, Wrin T, Liegler T: Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med.* 2001; 344: 472-480

Delaugerre C, Valentin MA, Mouroux M: Re-occurrence of HIV-drug mutations after treatment re-initiation following interruption in patients with multiple treatment failure. *AIDS* 2001; 15: 2189-2191

Devereux HL, Emery VC, Johnson MA, Loveday C: Replicative fitness in vivo of HIV-1 variants with multiple drug resistance-associated mutations. *J Med Virol.* 2001; 65(2): 218-224

Devereux HL, Youle M, Johnson MA, Loveday D: Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999; 13: F123-F127

Dronda F, Casado JL, Moreno S, Hertogs K, Garcia-Arata I, Antela A, Perez-Elias MJ, Ruiz L, Larder B (NELSANE STUDY): Phenotypic cross-resistance to nelfinavir: the role of prior antiretroviral therapy and the number of mutations in the protease gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17(3): 211-215

Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kucherer C : Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 ; 26(3) : 266-273

Eastman PS, Mittler J, Kelso R, Gee C, Boyer E, Kolberg J, Urdea M, Leonard JM, Norbeck DW, Mo H, Markowitz M: Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 associated with loss or suppression of plasma viral RNA levels in subjects treated with ritonavir (Norvir) monotherapy. *J Virol.* 1998; 72(6): 5154-5164

Eberle J, Bechowsky B, Rose D, Hauser U, Von Der Helm K, Gurtler L, Nitschki H: Resistance of HIV type 1 to proteinase inhibitor RO 31-8959. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1995; 11: 671-676

Eiros JM, Labayru C, Hernandez B, Ortega M, Bachiller P, Ortiz de Lejarazu R: Prevalence of genotypic resistance in untreated HIV patients in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21(4): 310-313

Erali M, Page S, Reimer LG, Hillyard DR: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Testing: A Comparison of three Sequence-Based Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(6): 2157-2165

Feldt T, Oette M, Kroidl A, Gobels K, Leidel R, Sagir A, Kuschak D, Haussinger D: Atazanavir for treatment of HIV infection in clinical routine: efficacy, pharmacokinetics and safety. *Eur J Med Res.* 2005; 10(1): 7-10

Flemming I, Mertgen CP: Pathomechanismus der HIV-Infektion. Media Bibliothek. Pharmacia & Upjohn. 1999

Flexner C: HIV-Protease Inhibitors. *New England Journal of Medicine* 1998; 338(18): 1281-1290

Florance A, Elston R, Johnson M, Spreen W, St Clair M: Phenotypic and genotypic resistance to a new protease inhibitor, in HIV-1 virus samples from subjects failing amprenavir. *Antiviral Therapy* 2004; 9: 15

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD: Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 1984; 224: 500-503

Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC; Hui H, Biggar RJ, Neequaye AE, Whelan TM, Ho DD, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH: Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 2: Evidence for Distinct Sequence Subtypes with Differences in Virus Biology. *J Virol* 1994; 68:7433-7447

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM: Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436-441.

Garcia-Lerma JG, Heneine W: Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to reverse transcriptase and protease inhibitors: genotypic and phenotypic testing. *Journal of Clinical Virology* 2001; 21: 197-212

Gathe JC Jr, Ive P, Wood R, Schurmann D, Bellos NC, DeJesus E, Gladysz A, Garris C, Yeo J: SOLO: 48-week efficacy and safety comparison of once-daily fosamprenavir/ritonavir versus twice-daily nelfinavir in naive HIV-1 infected patients. *AIDS* 2004; 18(11): 1529-1537

Gelderblom HR, Bauer PG, Özel M, Höglund S, Niedrig M, Renz H, Morath B, Lundquist P, Nilsson A, Mattow J, Grund C, Pauli G: Morphogenesis and Morphology of Human Immunodeficiency Virus; p. 35-54. In *Membrane Interactions of HIV*, 1992. Editors Aloia RC, Curtain CC. Wiley-Liss, Inc.

Ghosn J, Wirden M, Ktorza N: No benefit of a structured treatment interruption based on genotypic resistance in heavily pretreated HIV-infected patients. *AIDS* 2005; 19: 1643-1647

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A: *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in previously healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. *N. Engl J Med* 1981; 305: 1425-1431

Greene WC: The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 308-317

Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, Maayan S, Parkin NT, Engelhard D, Lorber M, Istomin V, Shaked Y, Mendelson E, Ram D, Petropoulos CJ, Schapiro JM: Mutation D30N ist not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6): 2159-2165

Halfon P, Penaranda G, Khiri H, Xerridat B: Long-term persistence of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruption. *AIDS* 2005; 19: 1713-1714

Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, Thompson MA, Carpenter CC, Fischl MA, Gazzard BG, Gatell JM, Hirsch MS, Katzenstein DA, Richman DD, Vella S, Yeni PG, Volberding PA: Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society – USA panel. *JAMA* 2006; 296(7): 827-843

Hammond J, Jackson L, Grahahm J: Antiviral activity and resistance profile of AG-001859, a novel HIV-1 protease inhibitor with potent activity against protease inhibitor-resistant strains of HIV. *Antiviral Therapy* 2004; 9: 17

Hance AJ, Lemiale V, Izopet J, Lecossier D, Joly V, Massip P, Mammano F, Descamps D, Brun-Vezinet F, Clavel F: Changes in human immunodeficiency virus type 1 populations after treatment interruption in patients failing antiretroviral therapy. *J Virol* 2001; 75(14): 6410-6417

Hirsch MS, Brun-Vézinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday G, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richman DD: Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection. *JAMA* 2000; 283(18): 2417-2426

Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Joh PR: An African primate lentivirus (SIVsm) closely related HIV-2. *Nature* 1989; 339(6223): 389-392

Ho DD: Time to hit HIV, Early and Hart. *N Engl J Med.* 1995; 333(7): 450-451

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-126

Isopet J, Souyris C, Hance A, Sandres-Saune K, Alvarez M, Pasquier C, Clavel F, Puel J, Massip P: Evolution of human immunodeficiency virus type 1 populations after resumption of therapy following treatment interruption and shift in resistance genotype. *J Infect Dis.* 2002; 185(10): 1506-1510

Jarvis B, Faulds D: Nelfinavir. A review of its therapeutic efficacy in HIV infection. *Drugs* 1998; 56(1): 147-167

Jäger H: Therapiechancen bei AIDS. Media Bibliothek. Pharmacia & Upjohn. 1997

Jimenez, JL, Resino S, Martinez-Colom A, Bellon JM, Munoz-Fernandez MA: Mutations at codons 54 and 82 of HIV protease predict virological response of HIV-infected children on salvage lopinavir/ritonavir therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2005

Kagan RM, Fenwick RF, Merigan TC: Recent trends in HIV-1 drug resistance genotypes in the patient population referred to a clinical diagnostics reference laboratory. *Antivir Ther* 2000; 5(3): 125

Kantor R, Fessel WJ, Zolopa AR, Israelski D, Shulman N, Montoya JG, Harbour M, Schapiro JM, Shafer RW: Evolution of primary protease inhibitor resistance mutations during protease inhibitor salvage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(4): 1086-1092

Katlama C, Dominguez S, Goullain K, Delaugerre C, Legrand M, Tubiana R, Reynes J, Molina JM, Peytavin G, Calvez V, Costagliola D: Benefit of treatment interruption in HIV-infected patients with multiple therapeutic failures: a randomized controlled trial (ANRS 097). *AIDS* 2004; 18(2): 217-226

Kaur A, Rosenzweig M, Johnson RP: Immunological and acquired immunodeficiency syndrome pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 355(1395): 381-390

Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, Bernstein BM, Japour AJ, Sun E, Rode RA: Identification of Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus Protease That Correlate with Reduced Susceptibility to the Protease Inhibitor Lopinavir among Viral Isolates from Protease Inhibitor-Experienced Patients. *Journal of Virology* 2001; 75: 7462-7469

Kempf DJ, King MS, Bernstein B, Cernohous P, Bauer E, Moseley J, Gu K, Hsu A, Brun S, Sun E: Incidence of Resistance in a Double-Blind Study Comparing Lopinavir/Ritonavir plus Stavudine and Lamivudine to Nelfinavir plus Stavudine and Lamivudine. *JID* 2004; 189: 51-60

Kijak GH, Pampuro SE, Avila MM, Zala C, Cahn P, Wainberg WA, Salomon H: Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naïve patients in Argentina. *Antivir Ther.* 2001; 6(1): 71-77

Larder BA, Darby G, Richman DD: HIV with Reduced Sensitivity to Zidovudine (AZT) Isolated During Prolonged Therapy. *Science* 1989; 243: 1731-1734

Lawrence J, Mayers DL, Huppler Hullsiek K, Collins G, Abrams DI, Reisler RB, Crane LR, Schmetter BS, Dionne TJ, Saldanha JM, Jones MC, Baxter JD: Structured Treatment Interruption in Patients with Multidrug-Resistant Human Immunodeficiency Virus. *N Engl J Med* 2003; 349(9): 837-846

Levy JA: Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiol Rev* 1993; 57: 183-289

Lichterfeld M, Wohrmann A, Schmeisser N, Fatkenheuer G, Salzberger B, Wyen C, Schmitz K, Sauerbruch T, Rockstroh JK: Superior virological efficacy of ritonavir-boosted protease inhibitor regimes compared to single protease inhibitor therapy. *Eur J Med Res.* 2003; 8(2) : 56-60

Little S, Holte S, Routy J, Daar ES, Markowitz M, Collier AC: Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl J Med* 2002; 347: 385-394

Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV: CD8⁺-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998; 18(4): 332-340

Maguire MF, Guinea R, Griffin P, Macmanus S, Elston RC, Wolfram J, Richards N, Hanlon MH, Porter DJ, Wrin T, Parkin N, Tisdale M, Furfine E, Petropoulos C, Snowden BW, Kleim JP: Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutations in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro. *J Virol* 2002; 76(15): 7398-7406

Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F: Retracting the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol* 2000; 74: 8524-8531

Manfredi R, Calza L: HIV genotypic mutation selectively induced by the protease inhibitor nelfinavir at codon 30. Case series and consequences on antiretroviral management. *Infez Med* 2002; 10(3): 151-160

Manfredi R, Calza L: HIV genotypic Mutations Evoked by Nelfinavir-based Regimes: Frequency, Background, and Consequences on Subsequent Treatment Options. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2002; 30(2): 258-260

Mansky LM, Temin HM: Lower in Vivo Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 than that Predicted from the Fidelity of Purified Reverse Transcription. *J Virol* 1995; 69: 5087-5094

Marcelin AG, Affolabi D, Lamotte C, Mohand HA, Delaugerre C, Wirden M, Voujon D, Bossi P, Ktorza N, Bricaire F, Costagliola D, Katlama C, Peytavin G, Calvez V: Resistance profiles observed in virological failures after 24 weeks of amprenavir/ritonavir containing regimen in protease inhibitor experienced patients. *J Med Virol.* 2004; 74(1): 16-20

Markland W, Rao BG, Parsons JD, Black J, Zuchowski L, Tisdale M, Tung R: Structural and Kinetic Analyses of the Protease from an Amprenavir-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutant Rendered Resistant to Saquinavir and Resensitized to Amprenavir. *Journal of Virology* 2000; 74: 7636-7641

Markowitz M, Conant M, Hurley A, Schluger R, Duran M, Peterkin J, Chapman S, Patick A, Hendricks A, Yuen GJ, Hoskins W, Clendeninn N, Ho DD: A preliminary evaluation of nelfinavir mesylate, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV)-1-protease, to treat HIV infection. *J Infect Dis.* 1998; 177(6): 1533-1540

Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Aquila RT: Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutations of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1999; 73(5): 3744-3752

Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Aquila RT: Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology* 2000; 275(2): 318-322

Masqualier B, Breilh D, Neau D, Lawson-Ayayi S, Lavignolle V, Ragnaud JM, Dupon M, Morlat P, Dabis F, Fleury H: Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46(9): 2926-2932

MacManus S, Yates PJ, Elston RC, White S, Richards N, Snowden W: GW433908/ritonavir once daily in antiretroviral therapy-naive HIV-infected patients: absence of protease resistance at 48 weeks. *AIDS* 2004; 18: 651-655

Miller V: Resistance to Protease Inhibitors. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2001; 26(1): 34-50

Miller V: International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001; 26(1): 34-50

Miller V, Sabin C, Hertogs K: Virological and immunological effects of treatment interruption in HIV-1 infected patients with treatment failure. *AIDS* 2000; 14: 2857-2867

Mo H, King MS, King K, Molla A, Brun S, Kempf DJ: Selection of resistance in protease inhibitor-experienced, human immunodeficiency virus type 1-infected

subjects failing lopinavir- and ritonavir-based therapy: mutation patterns and baseline correlates. *J Virol* 2005; 79(6): 3329-3338

Molla A, Granneman GR, Sun E, Kempf DJ: Recent developments in HIV protease inhibitor therapy. *Antiretroviral Research* 1998; 39: 1-23

Molla M, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo H-M, Markowitz M, Chernyavskiy T, Niu P, Lyons N, Hsu A, Granneman GR, Ho DD, Boucher CAB, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ: Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Medicine* 1996; 2: 760-766

Muzammil S, Ross P, Freire E: A major role for a set of non-active site mutations in the development of HIV-1 protease drug resistance. *Biochemistry* 2003; 24(3): 631-638

Negroni M, Buc H: Copy-choice recombination by reverse transkriptases: reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones. *Prox Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6385-6390

Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gutchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S, Boucher CA: Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 1999; 13(17): 2349-2359

Nijhuis M, Deeks S, Boucher CA: Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14(1): 23-28

Nunez M, De Mendoza C, Valer L, Casas E, Lopez-Calvo S, Castro A, Roson B, Podzamczar D, Rubio A, Berenguer J, Soriano V: Resistance mutations in HIV-infected patients experiencing early failure with nelfinavir-containing triple combinations. *Med Sci Monit.* 2002; 8(9): CR620-623

Oette M, Kaiser R, Daumer M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Knechten H, Mitrenga D, Beerenwinkel N, Sagir A, Pfister H, Haussinger D: Epidemiology of primary drug resistance in chronically HIV-infected patients in Nordrhein-Westfalen, Germany, 2001-2005]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007; 132(18):977-82

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci S: The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New Engl. J Med.* 1995; 334: 426-431

Parkin NT, Chappey C, Petropoulos CJ: Improving lopinavir algorithm through phenotype correlations: novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *AIDS* 2003; 17(7): 955-961

Patick AK, Mo H, Markowitz A, Appelt K, Wu B, Musick L, Kalish V, Kaldor S, Reich S, Ho D, Webber S: Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 1996; 40: 292-297

Patick AK, Duran M, Cao Y, Shugarts D, Keller MR, Mazabel W, Knowles M, Chapman S, Kuritzkes DR, Markowitz M: Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42(10): 2637-1644

Patick AK, Potts KE: Protease Inhibitors as Antiviral Targets. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 614-627

Paulsen D, Lao Q, Fusco G, St. Clair M, Shaefer M, Ross L: Genotypic and phenotypic cross-resistance patterns to lopinavir and amprenavir in protease inhibitor-experienced patients with HIV viremia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(14): 1011-1019

Pellegrin I, Breilh D, Montestruc F, Caumont A, Garrigue I, Morlat P, Le Camus C, Saux MC, Fleury HJ, Pellegrin JL: Virologic response to nelfinavir-based regimes: pharmacokinetics and drug resistance mutations (VIRAPHAR study). *AIDS* 2002; 16(10): 1331-1340

Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Bertoli A, Violin M, Monno L, Zauli T, Montroni M, Ippolito G, d'Arminio-Monforte A: Low prevalence of primary mutations associated with drug resistance in antiviral-naive patients at therapy initiation. *AIDS* 2002; 16(4): 619-624

Perry CM, Frampton JE, McCormack PL, Siddiqui MA, Cvetkovic RS: Nelfinavir: A review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 2005; 65(15): 2209-2244

Piana S, Carloni P, Rothlisberger U: Drug resistance in HIV-1-protease: Flexibility-assisted mechanism of compensatory mutations. *Protein Sci.* 2002; 11(10): 2393-2402

Prado JG, Wrin T, Beauchaine J, Ruiz L, Petropoulos CJ, Frost SD, Clotet B, D'Aquila RT, Martinez-Picado J: Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *AIDS* 2002; 16(7): 1009-1017

Preiser W, Rabenau, Doerr HW: Viren-, Viruserkrankungen. Zett-Verlag 2002, 145

Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA: Fidelity of HIV-1 reverse transkription. *Science* 1988; 242: 1168-1171

Re MC, Monari P, Bon I, Borderi M, Chiodo F; HIV-1 Emilia Romagna Infectious Disease Study Group: Conflicting interpretations of the prevalence of mutations associated with drug resistance in antiviral naive HIV-1 patients with acute and chronic disease. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23(2): 164-168

Resch W, Ziemann R, Parkin N, Garmarnik A, Swanstrom R: Nelfinavir-resistant, amprenavir-hypersusceptible strains of human immunodeficiency virus type 1 carrying an N88S mutation in protease have reduced infectivity, reduced replication capacity, and reduced fitness and process the Gag polyprotein precursor aberrantly. *J Virol* 2002; 76(17): 8659-8666

Richman DD, Bozette S, Morton S, Chien S, Wrin T, Dawson K: The prevalence of antiretroviral drug resistance in the U.S. Abstract of the 14th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Dec. 2001

RKI: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin, Sonderausgabe A, 17.03.2003

Roge BT, Katzenstein TL, Nielson HL, Gerstoft J: Drug resistance mutations and outcome of second-line treatment in patients with first-line protease inhibitor failure on nelfinavir-containing HAART. *HIV Med.* 2003; 4(1): 38-47

Ruf B, Pohle HD, Goebel F-D, L'age M: HIV-Infektion. Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Media Bibliothek. Pharmacia & Upjohn. 1996

Schinazi RF, Larder BA, Mellors JW: Mutations in retroviral genes associated with drug resistance: 2000 – 2001 update. *Int Antivir News* 2000; 8: 65-91

Schmit J-C, Ruiz L, Clotet B, Raventos A, Tor J, Leonard J, Desmyter J, De Clercq E, Vandamme A-M: Resistance-related mutations in the HIV-1 protease gene of patients treated for 1 year with the protease inhibitor ritonavir (ABT-538). *AIDS* 1996; 10: 995-999

Servais L, Plesséria J-M, Lambert C, Fontaine E, Robert I, Arendt V, Staub T, Schneider F, Hemmer R, Schmit J-C: Genotypic correlates of resistance to HIV-1 protease inhibitors on longitudinal data: the role of secondary mutations. *Antiviral Therapy* 2001; 6(4): 239-248

Servais J, Hainaut M, Schmitz V, Maes P, Fransen K, Vaira D, Brichard B, Arendt V, Schneider F, Hemer R, Schmit JC: Resistance testing in children changing human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Pediatr Infect Dis J.* 2002; 21(3): 214-220

Shafer RW: Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(2): 247-277

Simon V, Vabderhoeven J, Hurley A, Ramratnam B, Louie M, Dawson K: Evolving patterns of HIV-1 resistance to antiretroviral agents in newly infected individuals. *AIDS* 2002; 16: 1511-1519

Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA: Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 1995; 267: 988-993

Staszewski S, Babacan E, Stephan C, Haberl A, Carlebach A, Gute P, Klauke S, Hermschulte Y, Stürmer M, Dauer B: The LOPSAQ study: 48 week analysis of a boosted double protease inhibitor regimen containing lopinavir/ritonavir plus saquinavir without additional antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(5): 1024-30

Staszewski S, Dauer B, von Hentig N, Müller A, Stephan C, Carlebach A, Mösch M, Gute P, Klauke S, Kurowski M, Stürmer M: The Lopsaq Study: 24 week analysis of the double Protease inhibitor (PI) salvage regimen containing Lopinavir (LPV/r) plus Saquinavir (SQV) without any additional antiretroviral (ART) therapy. 2005

Stephan C, Hentig N, Kourbeti I, Dauer B, Mosch M, Lutz T, Klauke S, Harder S, Kurowski M, Staszewski S: Saquinavir drug exposure is not impaired by the boosted double protease inhibitor combination of lopinavir/ritonavir. *AIDS* 2004; 18(3): 503-508

Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, Babiker A, Burman W, Clumeck N, Cohen CJ, Cohn D, Cooper D, Darbyshire J, Emery S, Fatkenheuer G, Gazzard B, Grund B, Hoy J, Klingman K, Losso M, Markowitz N, Neuhaus J, Phillips A, Rappoport C: CD4⁺ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med.* 2006; 355(22): 2283-96

Stürmer M, Berger A, Doerr H-W: Modifications and Substitutions of the RNA Extraction Module in the ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2: Effects on Sensitivity and Complexity of the Assay. *Journal of Medical Virology* 2003; 71: 475-479

Stürmer M, Hermschulte Y, Hanke N, Staszewski S, Doerr HW: First Analysis of the Frankfurt HIV-1 resistance database: Distribution of mutational patterns. Welt-AIDS-Kongress Barcelona 2002, Abstract TuPeB 4588

Stürmer M, Staszewski S, Doerr H-W, Larder B, Bloor S, Hertogs K: Correlation of Phenotypic Zidovudine Resistance with Mutational Patterns in the Reverse Transkriptase of Human Immunodeficiency Virus Typ 1. Interpretation of Established Mutations and Characterization of New Polymorphisms at Codons 208, 211 and 214. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(1): 54-61

Sugiura W, Matsuda Z, Yokomaku Y, Hertogs K, Larder B, Oishi T, Okano A, Shiino T, Tatsumi M, Matsuda M, Abumi H, Takata N, Shirahata S, Yamada K, Yoshikura H, Nagai Y: Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(3): 708-715

Susman E: Many HIV-patients carry mutated drug-resistant strains. *Lancet* 2002; 359: 49

Svedhem V, Lindkvist A, Lidman K, Sonnerborg A: Persistence of earlier HIV-1 drug resistance mutations at new treatment failure. *J Med Virol.* 2002; 68(4): 473-478

Svicher V, Ceccherini-Silberstein F, Erba F, Santoro M, Gori C, Bellocchi MC, Giannella S, Trotta MP, Monforte A, Antinori A, Perno CF: Novel human immunodeficiency virus type 1 protease mutations potentially involved in resistance to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5): 2015-2025

Swainston Harrison T, Scott LJ: Atazanavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 2005; 65(16): 2309-2336

Tamalet C, Fantini J, Tourres C, Yahi N: Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS* 2003; 17: 2383-2388

Tamalet C, Pasquier C, Yahi N, Colson P, Poizot-Martin I, Lepeu G, Gallais H, Massip P, Puel J, Izopet J: Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. *J Med Virol.* 2000; 61(2): 181-186

Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, Pauwels R, Andries K, Janssen PA, Arnold E: Locations of Anti-AIDS Drug Binding Sites and Resistance Mutations in the Three-dimensional Structure of HIV-1 Reverse Transcriptase. *J Mol Biol* 1994; 243: 369-387

Tanuri A, Caridea E, Dantas MC, Morgado MG, Mello DL, Borges S, Traveres M, Ferreira SB, Santoro-Lopes G, Martins CR, Esteves AL, Diaz RS, Andreo SM, Ferreira LA, Rodrigues R, Reuter T, Cavalcanti AM, De Oliveira SM, De Barbosa HB, Teixeira PR, Chequer PN: Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol.* 2002; 25(1): 39-46

Tebas P, Henry K, Mondy K: Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+T cell decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies. *J Infect Dis* 2002; 186: 851-854

Tebas P, Patick AK, Kane EM, Klebert MK, Simpson JH, Erice A, Powderly WG, Henry K: Virologic responses to a ritonavir-saquinavir-containing regimen in patients who had previously failed nelfinavir. *AIDS* 1999; 13(2): F23-28

Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Nájera R: Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *The Lancet* 2002; 2: 461-471

Turner BG, Summers MF: Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 1999; 285: 1-32

Unaided/WHO: AIDS epidemic update, Dezember 2003

Vasudevachari MB, Zhang YM, Imanichi H, Imanichi T, Falloon J, Salzman NP: Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(11): 2535-2541

Violin M, Forbici F, Cozzi-Lepri A, Valleca R, Bertoli A, Riva C: Primary HIV-1 resistance in recently and chronically infected individuals of the Italian Cohort naive for antiretrovirals. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16: 37-43

Walsh JC, Pozniak AL, Nelson MR, Mandalia S, Gazzard BG: Virologic rebound on HAART in the context of low treatment adherence is associated with a low prevalence of antiretroviral drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002; 30(3): 278-287

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117-122

Winters MA, Schapiro JM, Lawrence J, Merigan TC: Human Immunodeficiency virus type 1 protease genotypes and in vitro protease inhibitor susceptibilities of isolates from individuals who were switched to other protease inhibitors after long-term Saquinavir treatment. *J Virol* 1998; 72(6): 5303-5306

Yates P, Hazen R, St Clair M, Boone L, Elston R: In vitro selection and characterization of resistance to the new HIV protease inhibitor GW640385. *Antiviral Therapy* 2004; 9: 16

Yerly S, Vora S, Rizzardi P, Chave JP, Vernazza PL, Flepp M: Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *AIDS* 2001; 15: 2287-2292

Young B, Johnson S, Bahktiari M, Shugarts D, Young RK, Allen M, Ramey RR 2nd, Kuritzkes DR: Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure. *J Infect Dis.* 1998; 178(5): 1497-1501

Zangh YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, Vasudevachari MB, Salzman NP: Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its gag substrate cleavage sites. *Journal of Virology* 1997; 71: 6662-6670

LEBENS LAUF

Name	Yvonne Hermschulte, geb. Laitschek	
Adresse	Rappstrasse 15 C 49084 Osnabrück	
Geburtsdatum	13. Mai 1968	
Geburtsort	Mainz	
Schulbildung	Aug. 1974 - Juli 1978:	Grundschule Mainz-Marienberg
	Aug. 1978 - Juni 1987:	Gutenberg-Gymnasium, Mainz (Abitur)
Ausbildung	Jul. 1987 - Jan. 1990:	Ausbildung zur Kauffrau im Groß- und Außenhandel, Autohaus Karl + Co., Mainz
Berufsweg	Feb. 1990 - Juni 1991:	Fremdsprachensekretärin, Schott Glaswerke, Mainz
	Jul. 1991 - Juli 1996:	Assistentin des Medizinischen Direktors, Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim
	Jul. 1996 - Sept. 1998:	Marketing-Assistentin Phytochemikalien, Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim
Studium	Okt. 1998 – Apr. 2005:	Studium der Humanmedizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Ärztl. Tätigkeit	Aug. 2005 – Feb. 2006:	Assistenzärztin, Klinikum Offenbach, Allgemeinchirurgie
	Seit März 2006:	Assistenzärztin, Niedersächs. Landeskrankenhaus Osnabrück, Psychiatrie
Dissertation	Seit Okt. 2001:	Dissertation am Institut für Medizinische Virologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Erstellung und Auswertung der Frankfurter HIV-Resistenz-Datenbank:
Korrelation von Punktmutationen in der Protease mit klinischen Parametern“**

im Zentrum für Hygiene – Institut für Medizinische Virologie, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Doerr, mit Unterstützung durch Herrn Dr. Martin Stürmer, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Daten aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Poster auf dem Welt-AIDS-Kongress 2002 in Barcelona
(First Analysis of the Frankfurt HIV-1 resistance database: Distribution of mutational patterns. Welt-AIDS-Kongress Barcelona 2002; Abstract TuPeB 4588)
- Journal of Antimicrobial Chemotherapy
(The LOPSAQ study: 48 week analysis of a boosted double protease inhibitor regimen containing lopinavir/ritonavir plus saquinavir without additional anti-retroviral therapy. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(5): 1024-30)

(Ort und Datum)

(Unterschrift)