

Elisabeth Black  
Dr. med.

Entwicklung eines phänotypischen und kompetitiven HIV-Resistenz- und Fitnessstests

Geboren am 16.04.1980 in Regensburg  
Staatsexamen am 19.10.2006 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Virologie (Hygieneinstitut)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Resistenzentwicklung gegen antiretrovirale Medikamente ist eines der größten Probleme in der HIV-Therapie. Arzneimittelresistenz führt zu Therapieversagen und schränkt weitere Behandlungsmöglichkeiten ein. Deshalb werden immer häufiger Resistenzbestimmungen für die Therapieplanung und in der Forschung eingesetzt. Phänotypischen Resistenzbestimmungen wird in bestimmten Fällen, z.B. für die Testung von neuen antiretroviralen Substanzen oder die Analyse schwer interpretierbarer oder unbekannter Genotypen, eine besondere Bedeutung beigemessen.

Gegen antiretrovirale Substanzen resistente HI-Viren sind häufig in ihrer Replikationsfähigkeit eingeschränkt. Inwieweit diese verminderte Fitness einen Einfluss auf die klinische Praxis hat ist noch nicht klar. Fitnessbestimmungen würden helfen Resistenzentwicklungen besser zu verstehen und somit Einfluss auf Therapiebeginn und Behandlungsstrategie nehmen. Es könnten Vorhersagen über die Progression der HIV-Infektion getroffen und neue, unbekannte Mutationen besser eingeschätzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, einen schnellen und sensitiven phänotypischen Resistenztest und einen kompetitiven Virusassay zur Bestimmung der viralen Fitness zu etablieren. Grundlage waren drei infektiöse, provirale HIV-Plasmide, die Nef-deletiert und mit den Markern Renilla-Luciferase, GFP und DsRed ersetzt sind. Die Replikation von NL-LUC, NL-GFP und NL-RED ist gegenüber NL4-3 zwar eingeschränkt, für die Zwecke dieser Arbeit aber ausreichend. NL-GFP und NL-RED replizieren mit gleicher Effizienz. Um beide Tests zu standardisieren, wurden Standardmutanten von NL-GFP, NL-RED und NL-LUC und Patientenplasmide mit den Markern GFP und DsRed kloniert.

Die phänotypischen Resistenzbestimmungen wurden mit dem Plasmid pNL-LUC durchgeführt. Die Infektiosität eines Virus wird nach Infektion einer Zelllinie mit Viren, die Renilla-Luciferase exprimieren, über die Messung der Aktivität dieses Enzyms bestimmt. Der *Luciferase-Assay* ist genauso sensitiv wie der *MAGI-Assay*, einer etablierten Methode zur Bestimmung der Infektiosität. Außerdem ist der *Luciferase-Assay* nicht wie der *MAGI-Assay* nur mit einer bestimmten Zelllinie möglich. Ein besonderer Vorteil des *Luciferase-Assays* gegenüber dem *MAGI-Assay* ist der geringere Zeitaufwand.

Zur Etablierung des kompetitiven Virusassays zur Bestimmung der viralen Fitness dienten die Plasmide, die mit den Markern GFP, DsRed oder mRFP verknüpft sind. Dabei wurde GFP entweder mit DsRed oder mit mRFP kombiniert. Nach Infektion mit diesen „farbigen“ Viren exprimieren die infizierten Zellen GFP, DsRed oder mRFP. Um den Virusassay auszuwerten wurden infizierte Zellen entweder im FACS detektiert oder die Intensität der Fluoreszenz nach der Infektion im Fluorometer bestimmt. MRFP ist aufgrund der im Vergleich zu DsRed kürzeren Reifungszeit und der rein roten Fluoreszenz der passende Partner für GFP. Im FACS jedoch konnte mRFP nicht vollständig detektiert werden, da der Wellenlängenbereich des verwendeten FACS-Gerätes nicht ausreichend ist. Mit dem Fluorometer dagegen konnten sowohl GFP als auch mRFP vollständig und unabhängig voneinander erfasst werden. Die

Fluorometrie ermöglicht es, den Fitnessstest einfach, schnell und sensitiv auszuwerten. Somit wurde ein kompetitiver Virusassay zur Bestimmung der viralen Fitness und der phänotypischen Resistenz mit den Markern GFP und mRFP und der Fluorometrie als Messmethode erfolgreich entwickelt.