

Poster

Vorhersage des HIV-1-Tropismus mittels Hochdurchsatzsequenzierung

Problemstellung

Mit der Zulassung des Korezeptorantagonisten Maraviroc (MVC) Ende 2007 wurde eine neue Wirkstoffklasse zur Behandlung der HIV-Infektion verfügbar. Da jedoch nur sogenannte CCR5-trope (R5) Viren an der Penetration in die Zielzelle gehindert werden, muss vor dem ersten Einsatz von MVC der Korezeptortropismus bestimmt werden. Der bisherige Goldstandard zur

Bestimmung des Korezeptorgebrauchs ist die sehr zeit- und kostenaufwendige Phänotypisierung. Die Vorhersage des Tropismus aus genotypischen Daten erscheint als kostengünstige und schnelle Alternative, ist jedoch in Bezug auf die Detektion von minoren CXCR4-tropen (X4) Varianten unterlegen.

Technische Lösung

Im Vergleich zur Standard-Direktsequenzierung ist die hochauflösende „454-Sequenzierung“ in der Lage eine heterogene Viruspopulation mit einem Höchstmaß an Sensitivität darzustellen. Die V3-Regionen aus Viruspopulationen von 14 therapieerfahrenen Patienten mit phänotypisch ermitteltem Tropismus (7 R5, 7 X4) wurden parallel mit dem Standardverfahren und der hoch-

auflösenden 454-Sequenzierung analysiert. Die Vorhersage des Korezeptortropismus erfolgte mit dem Programm geno2pheno[coreceptor]. Für die quantitative Analyse der R5/X4-Verteilung innerhalb der 454-Sequenzierdaten, wurde die vorhergesagte R5/X4-Wahrscheinlichkeit gegen die Häufigkeit in der Gesamtpopulation aufgetragen.

Ergebnisse

Im Bezug zum Phänotyp wurden aus den Daten der Standard-Direktsequenzierung ein R5- und vier X4-trope Isolate falsch vorhergesagt. Mit Hilfe der 454-Technologie wurden pro Isolat durchschnittlich 10.000 V3-Sequenzen erzeugt. Minore Sequenzvarianten mit einer hohen X4-Vorhersagewahrscheinlichkeit konnten in jeder der 14 Viruspopulation nachgewiesen

werden. Bei Verwendung des für den Phänotyp gebräuchlichen „cutoffs“ von 5% für die Detektion von X4-Minoritäten zeigte sich mit Ausnahme eines einzigen Isolats eine hohe Übereinstimmung mit phänotypischen Daten. Die hochauflösende Sequenzierung ist somit eine schnelle und zuverlässige Alternative zur phänotypischen Analyse.

Schlussfolgerung

Der Nachweis von X4-Viren in allen Isolaten deutet darauf hin, dass neben dem Tropismus auch die „Fitness“ von minoren X4-Varianten für das klinische Ansprechen auf CCR5-Korezeptorantagonisten eine wichtige Rolle spielen kann. Die hohe Sensitivität des 454 Sequencings von Roche in Kombination mit einer quantitativen Analyse ermöglicht die Etablierung klinisch re-

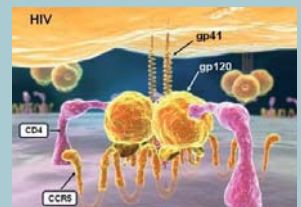
levanter Entscheidungsgrenzen zur Vorhersage des Ansprechens auf CCR5-Antagonisten in Gegenwart von X4-Minoritäten.

Derartige „cutoffs“ könnten durch Analyse von Rückstellproben (vor Therapieumstellung) unter Einbeziehung des sog. „optimized background regimen“ (OBR) retrospektiv bestimmt werden.

Glossar

HIV-1-Tropismus

Unter Tropismus versteht man in der Virologie die Affinität des Erregers zu einem bestimmten Typ von Wirtszelle. Im Fall von HIV-1 bezieht sich der Begriff vor allem auf das Vorhandensein des für T-Helferzellen typischen Oberflächenproteins CD4 sowie der Korezeptoren CCR-5 oder CXCR4.



Ultratiefe Sequenzierung

Ultra-deep sequencing ist der Fachbegriff für eine moderne Sequenzieretechnik zur Detektion von seltenen Mutationen oder Varianten, wie sie z.B. in heterogenen Viruspopulationen vorkommen. Als System der Wahl diente in der vorliegenden Studie das Genome Sequencer FLX Gerät von Roche Applied Science, das neben der hohen



Anzahl an Sequenz-Reads auch eine ausreichende Leseweite zur Detektion von verschiedenen Haplotypen erlaubt. Weitere ausführliche Informationen zum Genome Sequencer FLX erhalten Sie unter www.genome-sequencing.com oder bei der Fachlichen Information von Roche Applied Science unter Tel.: 0621/759-8568.

Quellenangabe



XVII International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical Implications von 10.-14. Juni 2008 in Melia Sitges, Spanien. Vortrag Martin Däumer, Institut für Immunologie und Genetik Hellmut-Hartert-Str. 1, 67655 Kaiserslautern www.immungenetik-kl.de