

Zusammenfassung

Mit der antiretroviralen Therapie (ART) konnte ein deutlicher Erfolg bei der Behandlung von HIV-infizierten Patienten erzielt werden. Bis jetzt ist es jedoch unmöglich mit antiretroviralen Medikamenten HIV-1 Patienten zu heilen. In den westlichen Ländern gab es in den letzten Jahren eine erneute Zunahme von HIV-1 Diagnosen, besonders unter homosexuellen Männern. In den Entwicklungsländern ist es unwahrscheinlich, dass durch ART die Epidemie von HIV-1 unter Kontrolle gebracht werden kann. Daher ist die Erforschung eines sicheren und wirksamen HIV-Impfstoffes von entscheidender Bedeutung um die Epidemie zu stoppen.

Trotz grosser Bemühungen sind empirische Ansätze zur Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen bisher fehlgeschlagen. Zur grössten Hürde in der Impfstoffentwicklung gehört die enorme Variabilität der HI-Viren. Bei der HIV-1 Ansteckung werden jedoch nur eine oder wenige virale Varianten auf den Empfänger übertragen. Dieser genetische Flaschenhals könnte eine Achillesferse des HI-Virus darstellen. Beim Menschen wird der biologische Übertragungsmechanismus jedoch nur bruchstückhaft verstanden. Vertieftes Wissen über den Mechanismus des genetischen Flaschenhalses, sowie über die Eigenschaften der übertragenen Viren könnten wesentliche Schritte zu einem effektiven Impfstoff sein. Die virale Diversität ist einerseits ein Hindernis in der Impfstoffentwicklung, andererseits ermöglicht sie auch phylogentische Studien des viralen Genoms. Die phylogenetische Analyse der viralen Sequenzen während der primären Phase der HIV-1 Infektion ermöglicht die frühen Wirt-Virus Interaktionen zu studieren, welches sonst nur im Tiermodell möglich ist.

In Kapitel 1 wird die Komplexität der übertragenen HIV-1-Populationen untersucht und nach Risikofaktoren geforscht, welche die Transmission von mehreren Viren ermöglicht. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Übertragung von mehreren genetischen Varianten nicht ausschliesslich von den Eigenschaften der Schleimhaut abhängig ist, wie dies in kürzlich publizierten Studien propagiert wurde. Die Übertragung von Virenstämmen, die den Co-Rezeptor CXCR4 benützen, ist ein seltenes Ereignis. Vorsicht ist geboten bei der Vorhersage der Co-Rezeptor-Nutzung durch genotypische Algorithmen, denn die Konkordanz dieser bioinformatischen Werkzeuge ist begrenzt.

Im Jahr 2009 traten weltweit schätzungsweise 2,6 Millionen neue Fälle von HIV-1 Infektion auf. Neuere Daten deuten auf eine hohe HIV-1-Übertragungsrate von Personen mit primärer HIV-1 Infektion. Kapitel 2 beschreibt die Transmissionsdynamik während der akuten Infektion über den Zeitraum der ART und in der chronischen Phase nach dem Absetzen der ART. Innerhalb phylogenetischer Cluster suchen wir mit Hilfe longitudinaler klinischer Daten nach Übertragungsmustern. Eine große Zahl von Neuinfektionen stammt von Patienten, welche die ART gestoppt hatten. Dies weist darauf hin, dass aktuelle präventive Bemühungen unzureichend sind. Diese Befunde sprechen für eine frühzeitige, kontinuierliche ART um die Ausbreitung von HIV-1, insbesondere bei Personen mit häufiger sexueller Aktivität, zu reduzieren.

Der Erfolg der ART in einem einzelnen Patienten wird durch die Messung viraler RNA im Blut überwacht. Aktuelle kommerziell erhältliche „Assays“ haben eine Nachweisgrenze zwischen 20 und 50 viraler RNA-Kopien pro ml Blut. In epidemiologischen Studien bezüglich des Übertragungsrisikos unter ART ist es nützlich, wenn auch einzelne replizierende Viren nachgewiesen werden können. Das HI-Virus verändert sich in hohem Masse. Daher müssen molekulare Nachweisverfahren eine breite Palette von Virenstämme erkennen. Kapitel 3 dieser Dissertation beschreibt eine Methode um phylogenetisch diverse Viren, wie HIV-1, mit einer hohen Sensivität zu detektieren.

Nach der primären HIV-Infektion nivelliert sich die Viruslast (VL) eines Patienten auf einem bestimmten Niveau ein. Dieser Wert, genannt viraler „setpoint“, kann mehr als 1000-fach zwischen Patienten variieren und ist ein Marker für den Krankheitsverlauf. Der virale „setpoint“ wird durch genetische Komponenten des Wirtes und des Virus bestimmt. In Kapitel 4 wird mit der Anwendung von „machine learning tools“ versucht, eine Signatur im viralen Genom zu identifizieren, welche mit einem tiefen viralen „setpoint“ assoziiert ist.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Patienten mit der Präsenz von Viren, welchen das Aminosäure-Muster 268E/358T fehlt, eine VL von > 5000 bei Studienbeginn aufzeigen und mit geringer Wahrscheinlichkeit das Virus nach Absetzen der ART kontrollieren können. Dieses Aminosäure-Muster in HIV-1 gp120 könnte sich *in vivo* negativ auf die virale Fitness auswirken.

HIV-1-Infektionen werden von einer oder wenigen viralen Varianten oder „Quasispezies“ initiiert. Anschließend nimmt mit fortschreitender Erkrankung die virale Diversität mehr oder weniger linear zu. So ist die virale genetische Vielfalt innerhalb eines Patienten potenziell informativ für das Alter der Infektion. Genotypische Resistenz-Tests werden heute routinemäßig bei Patienten mit einer HIV-1 Infektion durchgeführt. Die dazu verwendete Methode ist eine „bulk“-Sequenzierung der *pol*-Region. In Kapitel 5 analysieren wir, ob der Anteil der mehrdeutigen Nukleotide in den „bulk“-Sequenzen eines einzelnen Patienten Aufschluss über das Alter der Infektion aufgibt. Unsere Beobachtungen zeigen, dass der Anteil der mehrdeutigen Nukleotide mit einer Rate von 0,2% pro Jahr innerhalb der ersten 8 Jahre steigt. Darüber hinaus wird gezeigt, dass ein Anteil der mehrdeutigen Nukleotide von > 0,5% starke Beweise gegen eine frische Infektion liefert (Transmission < 1 Jahr vor der Probenahme).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass phylogenetische Studien der viralen Sequenzen verwendet werden können, um komplexe Fragestellungen wie epidemiologische Studien und HIV-1 Übertragungsmechanismen zu erforschen. Phylogenetische Analysen können zur Identifizierung von Transmissions-Paaren verwendet werden und das Erkennen von Übertragungsmustern hilft dabei, Präventionsstrategien zu verbessern. Das genaue Verständnis der initialen Abläufe während einer HIV-1 Neuinfektion könnte entscheidend sein für die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes. Phylogenetische Analysen viraler Sequenzen werden zukünftig an Bedeutung gewinnen, da zurzeit neue Sequenzierungstechniken etabliert werden und die Menge an Verfügbaren Sequenzen sprunghaft ansteigt.

Summary

Although a marked success of antiretroviral therapy (ART) in controlling human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, ART fails to cure patients from this virus. In addition, in developed countries there is an increase in new diagnoses of HIV-1, particularly in men having sex with men (MSM). In regions where HIV-1 has hit hardest it is unlikely to eradicate the virus by ART. Therefore, a safe and effective HIV-1 vaccine is crucial to halt the epidemic. Empirical approaches to the development of HIV-1 vaccines have so far, despite huge efforts, not been successful. Among the major obstacles is the enormous genetic variability. An Achilles heel of HIV-1 may be the genetic bottleneck during HIV-1 transmission, in which only one or a few viral variants, quasispecies, from a complex viral population in the source are transmitted to the recipient. However, knowledge about HIV-1 transmission biology in humans is still insufficient. Understanding the mechanisms of the genetic bottleneck and knowledge about the characteristics of the transmitted viral strains may help to design an effective HIV-1 vaccine. Contrarily to the obstacle in vaccine design, viral diversity enables phylogenetic studies of viral sequences. The phylogenetic investigation of viral sequences obtained during the acute and recent phase of HIV-1 infection facilitate the possibility to study transmission and early host/virus interactions which is otherwise only possible in animal models.

In chapter 1 investigation of the complexity of transmitted HIV-1 populations early after infection, and assessing potential factors associated with transmission of heterogeneous viral populations has been done. Our findings suggest that transmission of complex virus founder populations may not depend solely on mucosal factors, as suggested so far by recently published work. In addition, transmission of clinically relevant CXCR4-using viral strains seems to remain a rare event and caution is warranted predicting co-receptor usage by genotypic algorithms alone, because concordance of those tools is still limited.

In 2009, an estimated 2.6 million new cases of HIV-1 infection occurred. Recent data suggests high HIV-1 transmission rates caused by individuals with primary HIV-1 infection. Chapter 2 describes the study of transmission dynamics during the acute infection, during the aviremic phase over the period of ART, and during the chronic

stage after cessation of ART. We investigated transmission patterns within phylogenetic clusters by using longitudinal clinical data. Large numbers of new infections originated from patients who stopped ART indicating that current preventive efforts are insufficient. These findings argue for early, continuous ART to reduce the spread of HIV-1, in particular in individuals with frequent sexual activity.

The success of ART in an individual patient is monitored by measuring HIV RNA copy numbers in blood plasma. Current commercial available assays have a detection limit between 20 and 50 viral RNA copy numbers per ml blood. Regarding epidemiological studies of transmission events, also under therapy, it is of interest to also detect viral RNA at single copy sensitivity. In addition HIV-1 is continuously evolving at a high rate. Therefore molecular detection assays have to detect a wide range of viral strains. Chapter 3 of this dissertation describes a method to detect phylogenetically diverse viruses such as HIV-1 with single copy sensitivity.

After primary HIV-1 infection (PHI) each individual reaches a steady state level of plasma viral load which is referred to as viral setpoint. These setpoints between individuals can vary more than 1000 fold and are surrogate markers for disease progression. HIV-1 RNA levels are influenced by genetic characteristics of both the host and the virus. In chapter 4 we aim at identifying common genetic viral signatures associated with virologic control by applying machine learning tools. Our results suggest that presence of virus lacking the amino acid pattern 268E/358T is associated with viral load (VL) >5000 at baseline of PHI and with low probability of spontaneous virologic control after cessation of ART. These residues in HIV-1 gp120 might affect *in vivo* HIV-1 fitness.

HIV-1 infection is initiated by one or a few closely related viruses. Subsequently, viral diversity increases with disease progression. Thus, the viral genetic diversity within a patient is potentially informative about the age of infection. Genotypic resistance tests are routinely done in HIV-1 infected patients by bulk sequencing of the viral *pol* region. In chapter 5, we aimed if the fraction of ambiguous nucleotides (nt) within *pol* bulk sequences obtained from an individual patient is informative about the age of infection. We found that the fraction of ambiguous nts increased at a rate of 0.2% per year within the first 8 years. Additionally, we showed that a fraction of ambiguous nts

of >0.5% provides strong evidence against a recent infection event <1 year prior to sampling.

Taken together, phylogenetic studies of viral nucleotide sequences can be used to address complex aims such as epidemiological studies and HIV-1 transmission biology. Phylogenetic analysis can be used to detect transmission pairs and the knowledge about transmission dynamics can improve prevention strategies. Better understanding how HIV-1 establishes a new infection may turn out to be a prerequisite to design efficient HIV-1 vaccines. Additionally, in the future, the phylogenetic study of viral sequences will be of great importance because new sequencing techniques are currently developed, such as 454 sequencing, and the amount of available sequences will increase exponentially.