

# Quantifizierung mitochondrialer DNA in humanen Leukozyten unter antiretroviraler Therapie der HIV-Infektion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

vorgelegt von Christina Yassa geb. Michael,  
geboren in Unna/Nordrheinwestfalen

Sande 2013

Aus dem  
Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Institut für Medizinische Virologie  
Leiter Prof. Dr. med. John Ziebuhr  
Leiter bis 31. 3. 2010: Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich

Gutachter: Prof Dr.W.H Gerlich

Gutachter:Prof..Dr. K.S. Lips

Tag der Disputation: 12.05.2014

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1 Aufbau und Epidemiologie des HI-Virus .....	5
1.2 Therapie der HIV-Erkrankung .....	8
1.3 Nebenwirkungen der Therapie .....	12
1.4 Einfluss der HIV-Therapie auf die Mitochondrien .....	14
1.4.1 Funktion der Mitochondrien.. .....	14
1.5 Fragestellung der Arbeit .....	16
2. Material und Methoden .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Chemikalien .....	17
2.1.2 Geräte .....	17
2.1.3 Kits .....	18
2.1.4 Primer und Probes .....	18
2.1.5 Blutproben .....	19
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Präparation von Buffy-Coat .....	21
2.2.2 DNS Isolierung und Kit .....	22
2.2.3 LightCycler PCR .....	22
2.2.4 Real-time PCR der mitochondrialen DNS .....	23
2.2.5 Real-time PCR des H-ras .....	24
2.2.6 Messung von CMV DNS im Zellüberstand .....	25
3. Ergebnisse .....	26
3.1. Quantifizierung von mtDNA in Leukozyten .....	26
3.1.1 Nachweis der mtDNA bei HIV-Patienten .....	26
3.1.2 Standardisierung mit H-ras .....	28
3.1.3 Mitochondriales DNS/H-ras-Verhältnis bei gesunden Individuen .....	30
3.2 Mitochondriales DNS/H-ras-Verhältnis bei den HIV Patienten .....	31
3.3. mtDNS unter verschiedenen Therapieregimen .....	32
3.4 Messung von HCMV-DNS in Lymphozyten .....	33
4. Diskussion .....	35
4.1 Bedeutung der NRTI-bedingten mitochondrialen Toxizität .....	35
4.2 Alternative Methoden der mitochondrialen Toxizität .....	48
4.3 Mitochondrial ausgelöste Apoptose und Seneszenz .....	50

4.4 ART als perinatale Expositionsprophylaxe.....	53
4.5 Potentielle Therapiemöglichkeiten der mt Toxizität.....	58
5. Literaturverzeichnis.....	59
6. Anhang .....	72
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	72
6.2 Zusammenfassung.....	75
6.3 Summary .....	77
6.4 Erklärung gemäß §11(6) der Promotionsordnung des FB11 der JLU Gießen.	78
6.5 Lebenslauf.....	79
6.6 Danksagung .....	81

# 1. Einleitung

## 1.1 Aufbau und Epidemiologie

Im Jahr 1981 erschienen erste Berichte über eine Häufung einer tödlich verlaufenden Erkrankung bei zuvor gesunden homosexuellen Männern (Centers for disease control, 1981). Innerhalb von ca. zwölf Monaten kam es zur Definition des neuen Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) (Calzavara et al., 2002). Im Jahr 1983 isolierten französische Forscher ein Retrovirus als wahrscheinliche ätiologische Ursache (Barre-Sinoussi et al., 1983). Seit dem Jahre 1986 verwendet man die heute international gebräuchliche Bezeichnung HIV (Human immunodeficiency virus), wobei die Spezies HIV-1 und -2 unterschieden werden. Seit der Erstbeschreibung von HIV-1 im Jahre 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983) und HIV-2 drei Jahre später (Clavel et al., 1986) sind diese beiden Viren als Auslöser der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS definiert.

Die HI-Viren haben ihren Ursprung in Afrika. Verschiedene Affenarten sind mit jeweils einer eigenen Spezies von verwandten Immundefizienzviren (SIV: Simian immunodeficiency virus) infiziert, entwickeln jedoch keine Erkrankungen, außer wenn es zum Wirtswechsel kommt. Aus Schimpansen isolierte man das Isolat SIVcpz, das mit dem HIV-1 sehr eng verwandt ist (Allen et al., 2000; Price et al., 1997). Aufgrund von Sequenzunterschieden teilt man HIV-1 heute in 4 Gruppen ein: M (major) mit den Subtypen (clades) A, B, C, D, F, G, H, J, K, der Gruppe O (outlier), N (nonM, nonO) und P (Plantier et al., 2009). Ein Virusstamm der HIV-1-Gruppe M wurde mutmaßlich um 1940 in der Nähe von Kinshasa vom Schimpansen auf den Menschen übertragen und entwickelte sich in der Folge zum humanpathogenen HIV-1. Daneben hat es noch drei weitere Übertragungsereignisse gegeben, wobei die Gruppe O mutmaßlich vom Gorilla stammt (Hahn et al., 2000; Korber et al., 2000). Retrospektive serologische Untersuchungen ergaben, dass schon vor 1959 eine Serumprobe aus Kinshasa Antikörper (Ak) gegen HIV enthielt.

HIV gehört zur Virusfamilie *Retroviridae*, Gattung *Lentivirus*. Üblicherweise nimmt die Infektion mit diesen Viren einen chronischen Verlauf mit langer klinischer Latenzphase, persistierender Virämie mit ZNS-Beteiligung.

HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich im Molekulargewicht ihrer Proteine und der Reihenfolge ihrer Regulator-Gene, sind ansonsten jedoch hinsichtlich Morphologie

und Struktur sehr ähnlich. In Ihrer Pathogenität scheint es auch keine Unterschiede zu geben.

Der Durchmesser des HIV-1-Viruspartikels beträgt ca. 100 nm. Die Lipoproteinhülle des Virus enthält 72 etwa 10 nm messende env-Glykoprotein-(gp)-Komplexe, bestehend aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41) (Chan et al., 2007).

Wegen ihrer nur gering ausgeprägten Bindung an das gp41 in der Hüllmembran können diese gp120-Komplexe spontan freigesetzt werden, was als shedding bezeichnet wird. Man kann gp120 und seinen Vorläufer gp160 im Serum (Sunila, Vaccarezza et al., 1997) als auch im lymphatischen Gewebe der betroffenen Patienten finden. (Cruickshank et al., 1992). Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 lässt sich ebenfalls in der Virushülle nachweisen und dient mit anderen ähnlichen Wirtsproteinen dazu, die Anheftung an andere Zielzellen zu erleichtern. Besonders relevant für die Replikation des Virus sind die Reverse Transkriptase/RNaseH sowie die Integrase p32 und die Protease p11. Diese Enzyme sind gemeinsam mit den beiden Kopien der HIV-RNA als kegelförmige Kapside mit dem „core antigen“ (p24-Antigen) im Inneren zu finden, an der Innenseite der Virushülle gibt es das sog. p17 Matrixprotein.

Weltweit betrachtet gibt es heute, über 30 Jahre nach Entdeckung der HIV-Infektion, etwa 34 Millionen HIV-Infizierte, darunter ca. 3.3 Millionen HIV-infizierte Kinder.

Nahezu 30 Millionen Menschen erlagen bereits den Folgen von AIDS seit Beginn der Pandemie (Daten aus UNAIDS. Report on the Global AIDS Epidemic, 2012). Fast 97 % der HIV-Infizierten leben in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen vor allem in Subsahara-Afrika (UNAIDS. Core Slides: Global Summary of the AIDS Epidemic, 2012).

Die Anzahl der HIV-Neuinfektionen ist seit 2001 stetig um mehr als 20% zurückgegangen, in 25 Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen sogar um 50%. Dennoch sind 2011 ca. 2,5 Millionen Neuinfektionen, also 7.000 pro Tag, zu verzeichnen, davon 330.000 Neuinfektionen bei Kindern, und es gab 230.000 Todesfälle (<http://www.who.int/hiv/topics/tb/en/index.html>).

In Deutschland ist die Erstdiagnose der HIV-Infektion nach § 6 und 7 IfSG nicht-namentlich meldepflichtig. Seit dem Jahr 2001 hat sich die Zahl der Meldungen bis 2008 fast verdoppelt und verharrt nunmehr auf diesem hohen Niveau (Abb. 1).

#### Gemeldete HIV-Erstdiagnosen nach Jahr der Diagnose, Deutschland, 2001 bis 2011

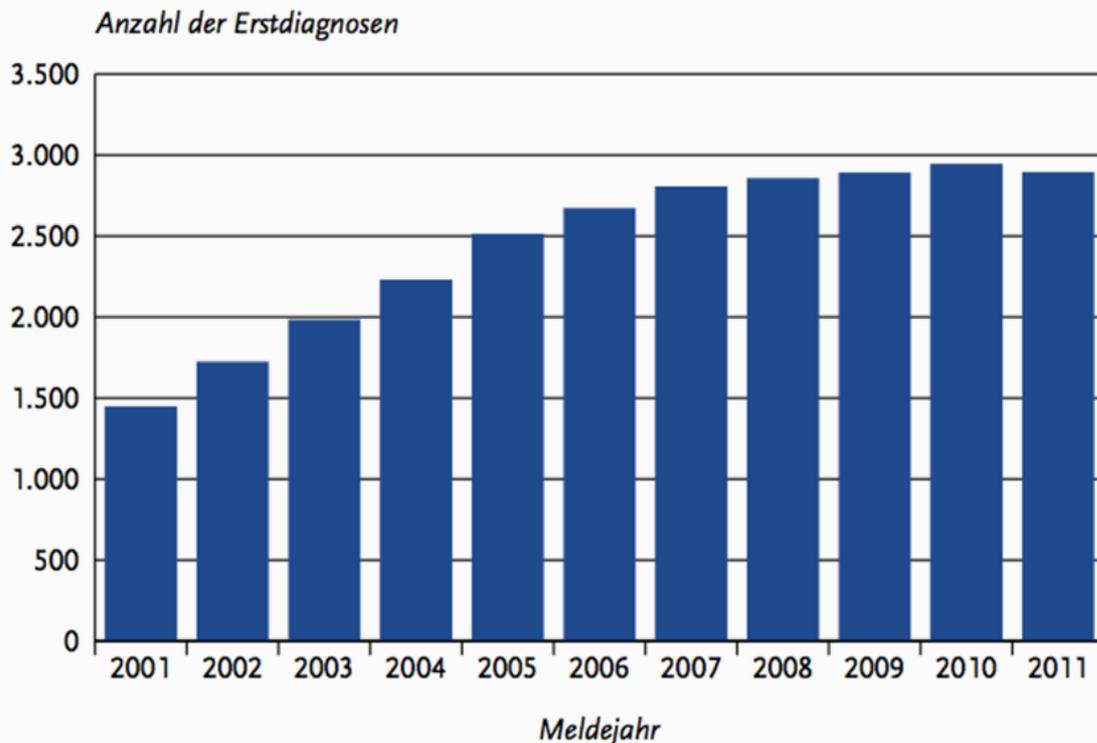


Abb.1 Grafik aus dem Epidemiologischen Bulletin (RKI, 2011)

Im Jahr 2011 wurden dem Robert Koch-Institut (RKI) 2.889 neu diagnostizierte HIV-Infektionen gemeldet (Hamouda et al., 2010). Somit entspricht dies einer bundesweiten Inzidenz von 3,5 Fällen pro 100.000 Einwohner. Gegenüber dem Jahr 2010 (2.939) ist die Zahl der neudiagnostizierten HIV-Infektionen damit kaum merklich zurückgegangen. Die Verteilung der Meldungen auf Bundesländer und Betroffenenengruppen ist gegenüber 2010 ebenfalls weitgehend unverändert geblieben (Bätzing-Feigenbaum et al., 2009). Eine auf Grundlage der Meldedaten durchgeführte Modellierung, in die der klinische Status und die CD4-Zellzahl bei Diagnose mit einfließen, legt allerdings nahe, dass zumindest für die Gruppe der Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), die Zahl der Neuinfektionen 2011 deutlicher abnahm als die Zahl der gesamten HIV-Neudiagnosen. Die Altersverteilung getrennt nach Geschlechtern (Abb. 2) zeigt allerdings, dass weiterhin vorwiegend jüngere männliche Erwachsene betroffen sind.

## Gemeldete HIV-Erstdiagnosen pro 100.000 Einwohner nach Alter und Geschlecht, Deutschland, 2011 (n=2.874)

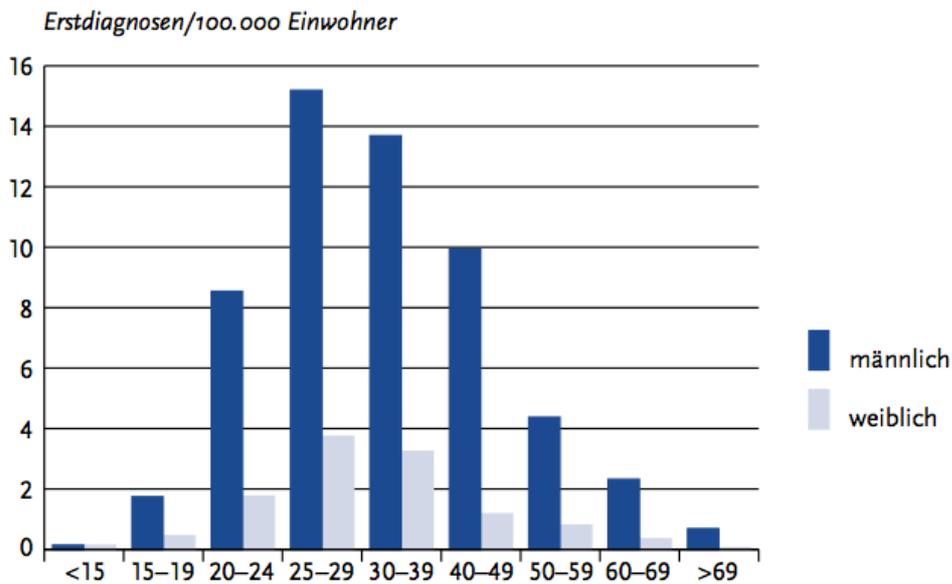


Abb 2. Angaben des Epidemiologischen Bulletin (RKI 2011)

### 1.2 Therapie der HIV-Infektion

Die Therapie der HIV-Infektion und ihrer Nebenwirkungen wird in einigen im Internet zugänglichen Publikationen dargestellt, die bei der Abfassung der folgenden Kapitel 1.2 -1.4 neben den Originalarbeiten zu Rate gezogen wurden: DGAI.net; HIVbuch.de bzw. HIV.net; sowie das Buch Molekulare Virologie von Modrow et al., 2010.

Für die Therapie der HIV-Infektion stehen verschiedene nukleosidische (NRTI) und nicht-nukleosidische (NNRTI) Hemmstoffe der Reversen Transkriptase sowie Inhibitoren der viralen Protease (PI), der Integrase (INI) oder des Viruseintritts (Entry-Inhibitoren) zur Verfügung. Sie werden miteinander kombiniert zur Behandlung der Patienten eingesetzt, um möglichst viele voneinander unabhängige Funktionen des Virus zu treffen, die für seine Vermehrung essenziell sind.

Im Jahr 2004, als die Arbeit konzipiert wurde, wurden dabei meist Mischungen von zwei verschiedenen Hemmstoffen der Reversen Transkriptase mit einem PI verwendet (DeJesus et al., 2004). Als *Nukleosidanaloga* dienten hauptsächlich Zidovudin (Azidothymidin, AZT), Zalcitabine (Didesoxycytosin, DDC), Didanosin

(Didesoxyinosin, DDI), Lamivudin (3TC) oder Abacavir. Sie kompetieren mit den natürlichen Nukleotiden um das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase und werden in die DNA-Stränge eingebaut; dies führt zum Kettenabbruch. Die nichtnukleosidischen Hemmstoffe wie Nevirapin, Delaviridin, Lovirid, Efavirenz binden sich an andere für die Funktion des Enzyms wichtige Domänen, beispielsweise an die Pyrophosphatbindungsstelle. Als PI. standen Saquinavir, Atazanavir, Darunavir, Lopinavir und Fosamprenavir jeweils mit Ritonavirbooster zur Auswahl. Sie kompetieren mit den natürlichen Spaltstellen in den Vorläuferproteinen Gag und Gagpol um das aktive Zentrum der viralen Protease und verhindern so die Virusreifung.

Seit 2004 hat sich die Therapie durch neue RT- und PI. erheblich weiterentwickelt (s. Tabelle 1 unten).

Tab.1. Von der Fachgesellschaft, Deutsche AIDS Gesellschaft, empfohlene Kombinationen von HIV-Therapeutika mit Angabe der Evidenzstufe aus der deutsch-österreichischen Leitlinie 2012

Kombinationspartner 1	Kombinationspartner 2
<p><b>Nukleosid-/Nukleotidkombinationen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tenofovir/Emtricitabin AII +</li> <li>- Abacavir /3TC AII1</li> </ul>	<p><b>NNRTI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Efavirenz, AII2</li> <li>- Nevirapin, AII3</li> </ul> <p><b>PI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atazanavir/r, AII</li> <li>- Darunavir/r, AII</li> <li>- Lopinavir/r, AII</li> <li>- Fosamprenavir/r, AII</li> </ul> <p><i>Alternative</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Saquinavir/r, BII</li> </ul> <p><b>INI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Raltegravir, AII</li> </ul>

Nahezu alle PI sind in Kombination mit niedrig dosiertem (1-2 x 100mg/d) Ritonavir (r) stärker wirksam („Ritonavir-Boosting“, PI/r) und deshalb in dieser Kombination unbedingt zu bevorzugen (Walmsley et al., 2002) Ritonavir hemmt die Metabolisierung der PIs durch Inhibition des Cytochrom P450 CYP 3A4 (Gathe et al.,

2004). Kombinationen aus 2 NRTI mit einem NNRTI, einem PI/r oder Raltegravir (INI) haben sich als sehr wirksam, sicher und gut verträglich erwiesen (Yeni et al., 2006), (Staszewski et al., 1999), (Gulick et al., 2006), (Eron et al., 2006), (Riddler et al., 2009). Langzeitdaten über mehrere Jahre liegen nicht für alle Kombinationen vor. Vorteile der Kombination zweier NRTI mit einem NNRTI sind die sehr gute Wirksamkeit, die einfache Applikation und ein niedrigeres Risiko kardiovaskulärer Komplikationen (Shafer et al., 2003), (Robbins et al., 2003), (Fris-Moller et al., 2007). Vorteil der Kombination zweier NRTI mit einem PI ist eine geringere Resistenzentwicklung bei nur wenig geringerer Wirksamkeit (Riddler et al., 2008). Raltegravir als erster verfügbarer INI erscheint Efavirenz mindestens gleichwertig zu sein (Lennox et al., 2009). Eine Kombination von drei NRTI ist den anderen Optionen unterlegen (Gulick et al., 2004).

Diese Empfehlungen zielen auf die Auswahl der Substanzen für den Therapiebeginn. Im Gegensatz zur Situation in Zulassungsstudien ist im Rahmen der Routinebehandlung zur Sicherung des Behandlungserfolges häufig ein Substanzwechsel notwendig. Dieser zielt auf eine Verbesserung der individuellen Verträglichkeit und die Anpassung der Therapie an die Lebenssituation der Patienten sowie an Medikamenten-Wechselwirkungen oder Begleitrisiken. Als Folge kann sich die Notwendigkeit ergeben, die Therapie mit einer hier nicht vorrangig empfohlenen Kombination fortzuführen. Dieses Vorgehen entspricht dem Stande der Erkenntnis und ist therapeutischer Standard.

Zudem wurden Mittel gegen weitere Zielstrukturen im Lebenszyklus des HIV entwickelt. So gibt es seit August 2002 das T20-Peptid (Enfuvirtid) als Hemmstoff des HIV-Eintritts sog. Fusionsinhibitoren: T20 entspricht der 38 Aminosäurereste umfassenden Heptadenwiederholungseinheit aus der zentralen Domäne des gp41, die sich vor der Transmembranregion dieses Proteins befindet. Während der Konformationsänderung des gp41 nach der Adsorption des Virus an Rezeptor und Corezeptor bilden diese Aminosäuren eine Coiled-Coil-Struktur, die Voraussetzung für die folgende Fusion der Virus- mit der Zellmembran ist (Jablonowski et al., 2004). Liegt T20 modifiziert mit einer Membranankerregion in der Membran der T-Lymphozyten und Makrophagen vor, verhindert es die für die Infektion notwendigen Umlagerungen in der Proteinstruktur. Die Zellen können nicht infiziert werden. Daneben gibt es neuerdings den CCR5-Corezeptor-Inhibitor Maraviroc, der allerdings nur auf HIV-Stämme mit diesem Zelltropismus wirkt.

Die Bedeutung von Nicht-Aids-Ereignissen als Hauptursache der Morbidität und Mortalität von HIV-Infizierten deutet auf den Nutzen einer frühen Therapie hin. Deshalb gibt es auch keine Kontraindikationen zur Therapie mehr. Vielmehr wird die Behandlung von asymptomatischen Patienten ab einer CD4-Zellzahl unter 500/ $\mu$ l empfohlen sowie bei höheren Helferzellzahlen in bestimmten Situationen (Thompson et al., 2010), z. B. Hepatitis-B-Koinfektion, Schwangerschaft, Alter über 60 Jahre usw. sowie in einer diskordanten Partnerschaft als Transmissionsprophylaxe.

Ist die Therapie einmal begonnen, sollte sie ohne Unterbrechung fortgesetzt werden. Einen Sonderfall stellt die akute HIV-Infektion dar. Ein Exanthem in der Hälfte der Fälle kennzeichnet diese Phase zusätzlich zu Fieber und einer Lymphadenopathie. Hier sollte die Behandlung möglichst noch vor der Serokonversion oder je nach klinischer Einschätzung bis zu 12 Wochen danach begonnen werden.

Als problematisch erweist sich das rasche Auftreten von resistenten HIV-Varianten, deren Replikation durch diese Inhibitoren nicht mehr beeinflusst werden kann. Offensichtlich induziert jedes Nukleosidanalogen die Selektion eines bestimmten Typs von Mutationen. Daher verfolgt man bei Therapieversagen (Ausbleibender Abfall der Viruslast unter die Nachweisgrenze) das Auftreten von resistenten Viren, indem man bestimmte Mutationen im Virusgenom durch Sequenzierungen nachweist. Mutationen können dann Resistenzen gegen bestimmte Hemmstoffe zugeordnet werden (genotypische Resistenzbestimmung). Werden sie identifiziert, wechselt man die Medikamentenkombination.

Durch wirksame Therapien kann die Konzentration des Virus im peripheren Blut bis unter die Nachweisgrenze (in der Regel 12 bis 40 Geq/mL) abgesenkt und die asymptomatische Phase der Infektion über Jahre verlängert werden. Bisher kann jedoch auch durch die highly active anti retroviral therapy (HAART) nur der Eintritt der HIV-Erkrankung in das Vollbild AIDS verzögert und so das Leben der Patienten verlängert werden; eine Heilung, das heißt die vollständige Eliminierung der viralen Erbinformation aus den Zellen des Organismus erfolgt nicht. Dies bedeutet, dass das Virus im Organismus über Reservoirs verfügt, in welchen es von den Hemmstoffen nicht getroffen wird. Es handelt sich dabei um HIV-Proviren, die bereits in der Frühphase der Infektion in das Genom von ruhenden T-Zellen integriert wurden. Werden diese T-Zellen aktiviert, dann erfolgt auch in ihnen die Produktion von infektiösen Viren. Deswegen versucht man, durch den gleichzeitigen Einsatz von Cytokinen die ruhenden Zellen zu aktivieren, um dadurch die Viren der

Hemmstoffwirkung zugänglich zu machen, bevor sich resistente Varianten bilden. Bei Einsatz der HAART sind natürlich auch die NW der antiviralen Chemotherapeutika zu beachten und den individuellen Reaktionen der Patienten anzupassen.

Die Therapieeinstellung hat sich vom ursprünglichen Konzept „hit hard and early“ zunächst zu „hit HIV hard but only when necessary“ (HARRINGTON et al., 2000) geändert. Es muss demnach immer von Patient zu Patient individuell abgewogen und entschieden werden. Außerdem werden opportunistische Infektionen entsprechend gezielt durch Antibiotika, Antiprotozoika und Antimykotika bekämpft. Später ging die Strategie jedoch erneut in Richtung „hit hard and early“ bzw. „hit hard and wise“, da sich gezeigt hatte, dass eine massive und größtenteils irreversible HIV-vermittelte Zerstörung der CD4+ Gedächtniszellen vor allem im Darm stattfindet. Diese scheinen sich allein bei Intervention während der primären HIV Infektionsphase mit bleibenden immunologischen Erfolg behandeln lassen (Fidler et al., 2008).

### **1.3 Nebenwirkungen der Therapie**

Die HAART verursacht sehr häufig ausgeprägte Nebenwirkungen. Diese können sowohl relativ unspezifisch sein, wie beispielsweise die häufig beobachteten gastrointestinalen Störungen (Appetitlosigkeit, Diarrhoen, Übelkeit, Meteorismus, Völlegefühl vor allem bei Therapiebeginn) als auch sehr spezifisch wie die Lipodystrophie. Fast 20 % der Patienten wollen aus Angst vor den NW gar nicht erst mit einer HAART beginnen (Highleyman et al., 2000). Die wichtigsten NW sollen hier in Anlehnung an HIV.net

(<http://eglobalmed.com/opt/AmedeoLiteratureGuide/www.hiv.net/2010/buch/nw.html>)

kurz beschrieben werden:

An ZNS-Störungen zeigen sich Alpträume, Schlafstörungen, Stimmungsschwankungen und Schwindel. In ausgeprägten Fällen kann es auch zu Depressionen und Wesensveränderungen kommen. (Marzolini et al., 2001)

- Nephrologisch kommt es bei etwa 10% der Betroffenen zu einer durch sog. Indinavirkristalle (bei entsprechender Einnahme) verursachten röntgen-negativen Nephrolithiasis mit Nierenkoliken. Niereninsuffizienzen sind eher selten (Olayaei 2000, Kopp 2002). Eine erhöhte Flüssigkeitszufuhr kann prophylaktisch effektiv sein.

- Die HIV Infektion selbst kann zu peripherer PNP führen. Durch manche Therapeutika kann diese jedoch verstärkt werden. Typischerweise zeigen sich ein distal symmetrisches Verteilungsmuster und sensomotorische Ausfälle. ( McArthur et al., 2003)
- Eine engmaschige Kontrolle der Transaminasen-, Cholinesterase- sowie Bilirubin-Werte ist vor allem bei Patienten mit anamnestisch bekannten Leberschäden essentiell (Sulkowski et al., 2000/2002). Ca. 2-18 % entwickeln Leberwerterhöhungen unter HAART (Bartlett et al ., 2001).
- Blutbildveränderungen sind ebenfalls als NW zu verzeichnen. Eine Anämie entwickelt sich bei 5-10% der Patienten unter AZT (Carr et al., 2000).
- Eine statistisch signifikante Reduktion des Hämoglobinwertes bei 34% der Patienten konnte in der ursprünglichen Phase II Studie, welche dem Wirksamkeitsnachweis von AZT diente, nachgewiesen werden (Richmann et al., 1987)
- Thrombozytopenien treten bei HIV Infektionen ebenfalls häufig auf. Hier ist einerseits eine immunvermittelte Zerstörung ursächlich, andererseits spielt jedoch auch hier die toxische Medikamentenwirkung neben der gestörten Blutbildung eine wichtige Rolle (Graff J et al., 2008 )
- HIV-Patienten zeigen vor allem bei AZT Therapie vermehrt therapieabhängige Granulozytopenien. Das Infektions- und Sepsis-Risiko steigt signifikant, wenn die Granulozytenzahl unter 500 Zellen/mm<sup>3</sup> abfällt (Hughes WT et al., 1997). Die Studie von Shaunak S et al., 1989 beschrieb die Behandlung von 30 Patienten mit ausgeprägter, wiederholt aufgetretener AZT-induzierter Granulozytopenie. Sie kam zu dem Ergebnis, dass die AZT-Therapie trotz Granulozytopenie fortgesetzt werden kann, ohne dass es zu einer erhöhten Inzidenz bakterieller Infektionen kommt, vorausgesetzt die Granulozyten fallen nicht unter 500 Zellen/ mm<sup>3</sup>.
- Bei der Lipodystrophie kommt es zu einer Fettumverteilung, einem Fettverlust bukkal sowie temporal als auch im Bereich der Extremitäten, sowie einem Fettüberschuss intra-abdominell und im Nacken. Eine Lipoatrophie (LA, Fat-Wasting) entwickelt sich etwa ein Jahr nach Therapiebeginn und ist irreversibel. Es zeigte sich in mehreren randomisierten Studien (Nolan et al., 2001;Mallon et al., 2003).vor allem Stavudin (d4T) als besonderer Risikofaktor. Daneben können auch AZT und andere NRTIs können zu ähnlichen Symptomen führen. Ultrastrukturelle Anomalien der Mitochondrien (mt) unter Stavudin (Walker et al.,

2002) und mtDNA Depletion im subkutanen Fettgewebe sind nachweisbar. Adipozyten zeigen bei verlängerter NRTI-Gabe neben der mtDNA Depletion zusätzlich eine reduzierte Expression adipogener Transkriptionsfaktoren (PPAR-gamma und SREBP-1), reduzierten Fettgehalt und zunehmende Apoptose. McComsey et al., 2004 zeigten, dass eine Therapieumstellung unter Stavudinvermeidung zu einer Erholung des Apoptoseanteils und der mtDNA führt, zudem konnte ein geringer Zuwachs an subkutanem Fett verzeichnet werden. Studien, bei denen PI vermieden wurden, führten hingegen weder zu einer Besserung der LA, noch des Fettgewebs-Apoptose-Index. Da die LA möglicherweise durch die mt-Toxizität erklärt werden kann, soll im Folgenden der Einfluss der HIV-Therapie auf die Mitochondrien genauer beschrieben werden.

## **1.4 Einfluss der HIV-Therapie auf die Mitochondrien**

### **1.4.1 Funktion der Mitochondrien**

Mitochondrien waren ursprünglich Bakterien (sehr wahrscheinlich aus der Ordnung Rickettsiales), die ganz früh in der Evolution von Eukaryonten aufgenommen und durch Verlust vieler Funktionen und Gene völlig von der Wirtszelle abhängig wurden. Als ein Relikt ihrer bakteriellen Herkunft haben sie Reste eines bakteriellen Genoms und zwar eine eigene Doppelstrang-DNA mit 16.000 Basenpaaren und auch ihre eigene DNA-Polymerase gamma, die für die Replikation der mitochondrialen DNA (mtDNA) erforderlich ist (Gray et al., 2001). Mitochondrien sind wie Bakterien von einer Doppelmembran umschlossene Organellen und vermehren sich durch Wachstum und Sprossung (Abb 3). Sie gelten als „Kraftwerk“ eukaryotischer Zellen und ihre Menge wird deren Energiebedarf entsprechend angepasst (Alberts et al., 2002).

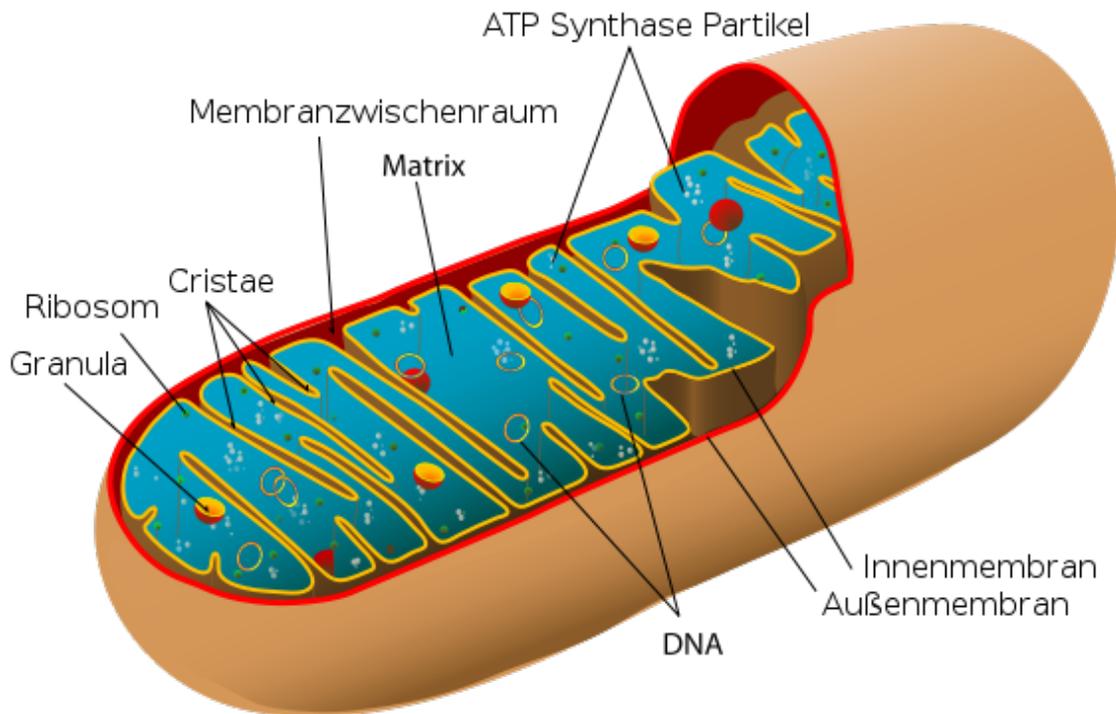


Abb.3 Aufbau eines Mitochondriums , Mariana Ruiz Villarreal. Lizenz „Public domain“

Das Mitochondrium hat eine äußere Membran, welche Kanäle aus Proteinkomplexen enthält, die für den Austausch von Ionen und Molekülen mit dem Cytosol der Zelle verantwortlich sind. Eine innere Membran umschließt die Matrix des Mitochondriums und enthält die großen für die Atmungskette verantwortlichen Proteinkomplexe. Der Raum zwischen beiden Membranen enthält Enzyme sowie ATP-Synthase-Partikel. Die starre Bohnenform aus Lehrbüchern ist nach aktuellem Stand nicht mehr richtig, es handelt sich eher um ein mt-Netzwerk (Jakobs et al., 2004).

In den Mitochondrien läuft der Citrat-Zyklus ab. Es wird Pyruvat aus dem Cytosol in die Mitochondrien Matrix transportiert. Die Pyruvat-Dehydrogenase decarboxyliert es dann zu Acetyl-CoA. Das Acetyl-CoA kann außerdem auch aus der  $\beta$ -Oxidation des Fettsäureabbaus durch die innere Mitochondrienmembran gelangen. Im Citrat Zyklus wird dann NADH und  $FADH_2$  gewonnen und in der Atmungskette ATP.

Hierbei wird über einen Elektronen-Transportvorgang ein elektrochemischer Gradient in der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut, der die ATP-Herstellung mittels ATP-Synthase ermöglicht.

Mitochondrien können zudem durch ihre calciumspeichernde Fähigkeit den Calcium-Haushalt der Zelle beeinflussen.

Eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien liegt in der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, die für viele Enzyme der Atmungskette essentiell sind. Aus diesem Grund sind fast alle eukaryotischen Zellen zum Überleben auf Mitochondrien angewiesen (Lill et al., 1999).

Mitochondrien produzieren ATP und metabolisieren NADH und FADH, welche Endprodukte des Fettsäureabbaus darstellen. Bei mt-Toxizität kann man häufig fein- und grobtropfige Akkumulation intrazellulärer Triglyzeride nachweisen, welche sich dadurch erklären läßt (Löffler et al., 1997).

### **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, das Ausmaß der mitochondrialen Toxizität unter verschiedenen Therapieregimen in peripheren Leukozyten von HIV-Patienten zu ermitteln. Hierzu sollte als Parameter die absolute Menge der mitochondrialen DNA in isolierten Leukozyten im Vollblut als Parameter herangezogen werden.

Eine Methode zur Quantifizierung der mtDNA mittels real-time-PCR sollte etabliert und zur Bestimmung der Absolutmenge geeicht werden. Um die Konzentration der mtDNA in einem isolierten Buffy-Coat der EDTA-Plasmaproben auf die Leukozytenzahl des Lysates beziehen zu können, sollte ebenfalls eine Quantifizierung der lysierten Zellkerne (und damit der Leukozyten) mittels real-time-PCR erfolgen aus dem gleichen Isolat und Lysat. Diese Bestimmung der isolierten Leukozytenkonzentration soll zusätzlich auf ihre Funktionalität anhand labormedizinisch ermittelter Zellzahlen bezogen und überprüft werden.

Der Quotient aus gemessener mtDNA und isolierten Leukozyten im Buffy-Coat sollte mithin die Anzahl mtDNA-Moleküle pro Leukozyt ergeben. Mit EDTA-Plasma von gesunden Personen sollte eine Abschätzung des Normalwertes erfolgen.

Die etablierten Methoden sollten dann auf Proben aus einer multizentrischen HIV-Therapiestudie der Universität Bonn (Prof. Rockstroh) angewendet werden. Die ermittelten mtDNA-Konzentrationen pro Leukozyt sollten dabei im Verlauf sowie zwischen verschiedenen Therapieregimen verglichen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

- Das Institut für Medizinische Virologie in Giessen, in dem die experimentelle Arbeit durchgeführt wurde, verfügt über eine Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) aus der das Wasser für die hergestellten Lösungen stammte.
- Alle nicht im folgenden aufgeführten Substanzen kamen von den Firmen Roth in Karlsruhe, Merck in Darmstadt sowie Sigma Chemie in Deisenhofen.
- Um die Röhrchen zur Herstellung des Buffy-Coats für den PCR-Standard zu silikonisieren, wurde Sigmacote®SL-2 Lot 103K4360 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) verwendet.
- Agarose-SEAKEM 1:1 FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
- ECL-Detection-Reagents, Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg, Kat. Nr. RPN 2109
- SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. Kat. Nr. 1 988 131, Roche Diagnostics, Mannheim. Die Lösung wird 1:900 mit DEPC-Wasser verdünnt.
- TEMED; Serva Feinbiochemika, Heidelberg

#### **2.1.2 Geräte**

LightCycler Realtime PCR-Gerät	Roche Diagnostics, Mannheim
Zentrifuge Biofuge 1512	Heraeus, Osterode/Harz
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des Institutes
Blot-Kammer	Stratagene, Heidelberg

### 2.1.3 Kits

**DNA-Extraktionskit.** Für die Extraktion humaner DNA wurde das „QIAamp DNA Blood Mini Kit for whole blood, serum, plasma and buffy coat“ (Qiagen, Hilden Katalog Nr. 51304; Lot. Nr. 12185028) verwendet. Beschrieben ist es im gleichnamigen Handbuch von Qiagen S. 27 Blood and Body Fluid purification for LightCycler FastStart DNA Spin Protocol.

Für die Extraktion der **CMV-DNA** wurde der MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Version November 2005) Kat. Nr. 03730964001, Roche Diagnostics, Mannheim, verwendet.

Für die **real-time PCR zur Bestimmung der CMV-DNA** wurde das Kit für LightCycler® Fast Start DNA Master Hybridization Probes von Roche Diagnostics, Mannheim Kat. Nr. 03 003 248 001 eingesetzt. Das Kit enthält den Reaktionsmix mit PCR-Puffer, die DNA-Polymerase und Magnesiumchlorid.

### 2.1.4 Primer und Probes

Die Sequenzen der Primer und Probes für die Bestimmung der mtDNA und der H-ras DNA wurden freundlicherweise von Dr. Thilo Jonas und Dr. Christian Schüttler zusammengestellt und wurden von der Fa. TibMolBiol, Berlin auf Bestellung hergestellt.

Die Reagenzien für die **CMV-DNA-Bestimmung** waren direkt lieferbar.

gB-for; Produkt Nr. 641730	CM 1s; ; Produkt Nr. 641736
gB-rev; Produkt Nr. 641731	CM1as; ; Produkt Nr. 641737
gB-FL; Produkt Nr. 641732	CM1F; ; Produkt Nr. 641734
gB-LC; Produkt Nr. 641733	CM1LR; ; Produkt Nr. 641735

Für die **mt DNA** wurden Primer aus dem humanen Cytochrom C Oxidase Gen (Genbank-Eintrag CCO1-BC02410) von der Firma MWG-Biotech AG ausgewählt.

CCO-1as Position 203	5'AAG ATT ACA AAT GCA TGG GC3'	181
CCO-1s Position 7	5'TTC GCC GAC CGT TGA TT3'	26

Für die Bestimmung von **H-ras** wurden die Sequenz 144-289 aus dem Genbankeintrag NM-005343 mit folgenden Primern verwendet:

298 5'TCTATAGTGGGGTCGTATTCGTCC3' as  
5'GGAGACCCTGTAGGAGGACCC3' 144 sense  
was ein Amplifikat von 154 bp Länge ergibt.

### **2.1.5 Blutproben**

Die gesunde Vergleichskollektivgruppe bestand aus 9 weiblichen und 6 männlichen Mitarbeiterinnen und Doktorandinnen unterschiedlichen Alters (22 - 59 Jahre, MW 29.Jahre. +/- 5 Jahre) der Justus-Liebig-Universität in Gießen, die von den Zielen der Studie unterrichtet waren.

- 1) weiblich 59 Jahre
- 2) männlich 27 Jahre
- 3) weiblich 21 Jahre
- 4) weiblich 48 Jahre
- 5) weiblich 35 Jahre
- 6) weiblich 24 Jahre
- 7) männlich 23 Jahre
- 8) weiblich 46 Jahre
- 9) männlich 24 Jahre
- 10) männlich 24 Jahre
- 11) weiblich 25 Jahre
- 12) männlich 20 Jahre
- 13) weiblich 22 Jahre
- 14) weiblich 25 Jahre
- 15) männlich 33 Jahre
- 16) männlich 23 Jahre

Die Studienproben stammten von HIV-Patienten der Abteilung Infektiologie (Leiter Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer) an der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen und waren im Rahmen einer von Prof. Dr. med. Jürgen Rockstroh geplanten Studie gesammelt worden (Universitätsklinikum Bonn, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Allgemeine und Innere Medizin, Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn).  
E-mail: [rockstroh@uni-bonn.de](mailto:rockstroh@uni-bonn.de)

Die Patienten wurden im Zeitraum von November 2003 bis November 2005 nach folgenden Kriterien (übersetzt aus dem Studienprotokoll der Rockstroh Studie) ausgewählt:

- Alter der Patienten mindestens 18 Jahre

- Patient erhält erstmals antiretrovirale Therapie
- BMI 18 > x < 30
- Vitalparameter, klinische Untersuchung und Laborwerte zeigen keine Hinweise auf akute Erkrankungen
- Patient zeigt sich einverstanden während der gesamten Dauer der Studie keine antidiabetische Medikation, Lipidsenker, Hormone, Vitamin B-Komplex, Appetitzügler, Sulfonamide, Tetrazykline oder Pharmakotherapie zum Raucher- und Alkoholentzug einzunehmen
- Patient nimmt keine Phytotherapeutika, Alkohol, Drogen und Medikamente ohne den Studienleitern und Verantwortlichen darüber zu informieren

Ursprünglich waren 90 Studienpatienten eingeplant die, zu je 30, auf drei verschiedene ART Regime-Zweige aufgeteilt werden sollten:

- D4T+ 3TC+ Lopinavir (Kaletra) als first-line antiretroviraler Kombinationstherapie
- D4T+ 3TC+ Efavirenz (Sustiva) als first-line HAART
- TFV (Tenofovir)+ 3TC+ Kaletra als first-line antiretroviraler Kombinationstherapie

Zu jedem Patienten gibt es drei Proben:

- eine Baseline-Probe vor Beginn der ART
- aus der 24. Woche nach Therapiebeginn
- sowie aus der 48. Woche nach Therapiebeginn.

Die Verschlüsselung der Patienten erfolgt mit drei Komponenten:

*einer Ziffer*

01- für Patienten aus Bonn

02- für Patienten aus Gießen

03- für Patienten aus Koblenz

04- für Patienten aus Mainz,

*einem Großbuchstaben*

A- für Therapiezeitweig D4T+ 3TC+ Kaletra

B- für Therapiezeitweig D4T+ 3TC+ Efavirenz

C- für Therapiezeitweig TFV+ 3TC+ Kaletra,

und der chronologischen Patientenummer.

Leider sistierte die Probenzusendung erheblich und das Probenvolumen war teilweise sehr gering, womit es in Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung der Arbeit zu erheblichen Einschränkungen kam. Vielfach fehlen Abnahmen und die Gesamtzahl der aufgearbeiteten Proben belief sich mit 35 auf deutlich weniger als einem Drittel der ursprünglich geplanten Werte. Teilweise ist dies auf hämolytische Proben als auch auf den Tod mancher Studienteilnehmer zurückzuführen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Präparation von Buffy-Coat**

Der Buffy-Coat wurde nach einem laborinternem Protokoll hergestellt. Die Methode wurde von Herrn Dr. Jonas übernommen. Der Buffy-Coat (Abb. 4) ist die Fraktion des antikoagulierten Blutes, welche nach der Zentrifugation die meisten weißen Blutzellen und Thrombozyten enthält.

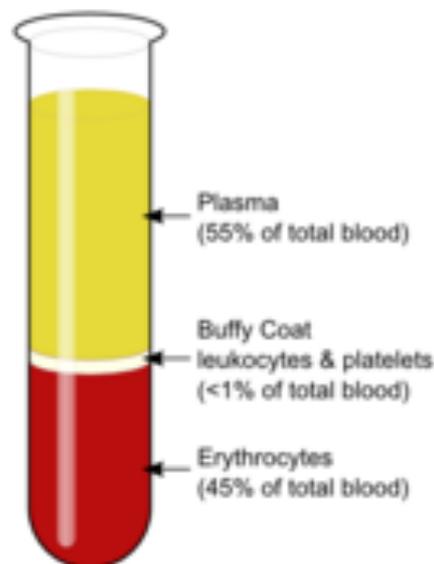


Abb.4 Zentrifugierte Probe mit 3 Phasen Abb. aus Wikipedia, der freien Enzyklopädie, <http://de.wikipedia.org/wiki/Buffy-Coat>

Zur Gewinnung des Buffy-Coat aus EDTA-Blut wurde die Probe sofort oder eventuell nach bis zu drei Tagen bei 4°C verarbeitet. Es werden ca. 200 µl Vollblut in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Gefäß (Eppi) pipettiert (Probe A) und in 4-6 Portionen in 2 ml Eppis aliquotiert. Es folgt Zentrifugieren bei 4000 U/ min für 3 Minuten. Wie in

Abb. 4 schematisch dargestellt bilden sich 3 Phasen: Oben das Plasma, dann eine weiße Grenzschicht, welche meist nur < 1% des Blutvolumens ausmacht (Buffy-Coat) und unten die Erythrozyten. Meist ist der Buffy-Coat weißlich, er kann jedoch auch grün sein, wenn die Probe viele Neutrophile enthält, welche reich an grüner Myeloperoxidase sind. Man füllt ein Schraub-Eppi mit dem EDTA-Plasma, welches abpipettiert wurde (Probe1). Durch kreisförmige Aspiration knapp über der weißlichen Grenzschicht hebt man den Buffy-Coat ab. Die gesamte Menge an aspiriertem Buffy-Coat wird in zwei neue Eppis überführt und erneut zentrifugiert. Der Buffy-Coat wird wieder abgehoben und in ein weiteres Eppi überführt. 200 µl Buffy-Coat kommen in ein 1,5 er Schraub-Eppi (Probe B). Der Rest des Buffy-Coats kommt in ein weiteres Schraub-Eppi (Probe 2). Die Gesamt DNS aus den Proben A und B wird mit dem QuiAmp DNA Minikit extrahiert und ergab die Proben 3 und 4. Die Proben 1-4 werden mit Patientenummer, Art (Plasma, Buffy-Coat, DNA-buffy, DNA-nativ) und Abnahmezeitpunkt (Baseline, 24 Woche, 48 Woche) beschriftet. Alle Proben werden bis zum weiteren Bearbeitungszeitpunkt bei -70 Grad tiefgefroren.

Die Plastikgegenstände, die mit den Proben in Berührung kamen, wurden vor Gebrauch silikonisiert: Röhrchen (Falcon) und Spitzen mit Silikonlösung befeuchten und dann trocknen lassen. Anschließend Zentrifugation in der Joan-Zentrifuge, Programm 5 für 10 min bei 4000 rpm.

### **2.2.2 DNA Isolierung und Kit**

Zur Extraktion der zellulären und mitochondrialen DNA wurde das QIAmp DNA Minikit (Kat.-Nr. 51306) der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers in leicht modifizierter Form verwendet (Jonas 2005). Die Methode beruht auf der reversiblen Bindung von Nukleinsäuren an eine Silika-Matrix. Um den Alkohol komplett aus der Matrix eliminieren zu können, musste ein weiteres Mal eine Zentrifugation ohne Waschlösung stattfinden noch bevor die Nukleinsäure eluiert wurde.

Anstelle des üblichen Puffers führten wir die Elution der Nukleinsäuren mit 100 µl H<sub>2</sub>O (zuvor behandelt mit dem Nukleasen-Inhibitor DEPC) durch, um eine Inhibition der PCR im LightCycler zu vermeiden, bei der keine zu hohen Salzkonzentrationen im Reaktionsgemisch vorliegen dürfen.

### **2.2.3 LightCycler PCR**

Das Prinzip der Real-time PCR mit dem LightCycler-System ist schon in mehreren früheren Doktorarbeiten des Instituts für Med. Virologie beschrieben worden, z. B. in der Arbeit von Dr. Jonas (2005). Es handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Standard-PCR. Bei der Real-time PCR wird nach jedem Amplifikationszyklus im Reaktionsgefäß das Fluoreszenz-Signal des PCR-Produktes gemessen. Die Anfangsmenge der DNA wird aus der Zahl der Zyklen berechnet, bei der das Signal im linearen Messbereich liegt. Zusätzlich kann am Schluss die Spezifität des amplifizierten Produktes durch eine sogenannte Schmelzkurve, d. h. Fluoreszenzänderung mit steigender Temperatur, überprüft werden. Zur Erzeugung eines fluoreszierenden Amplifikats kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz: **SYBR-Green**. Der Farbstoff SYBR-Green lagert sich in den DNA-Doppelstrang des Amplifikats ein und wird dadurch fluoreszierend, was nach Anregung durch UV Licht im LightCycler System gemessen werden kann. Zwischen spezifisch und unspezifisch amplifizierter DNA kann auf diese Weise allerdings nicht unterschieden werden.

**Fluoreszenz-markierte HybProbes**. Hybprobes sind zwei fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die komplementär zu einem Einzelstrang des Amplifikats sind. Ihre Sequenz ist so gewählt, dass sie sich während des Annealing an benachbarte Stellen der Einzelstrang DNA anlagern und dabei eine Lücke von einigen Nukleotiden lassen. Die 5' terminale HybProbe hat am 3'-Ende ein Fluoreszein-Molekül (Donor), die andere am 5'-Ende ein LC-Rot-Molekül (Akzeptor) kovalent gebunden. Die Akzeptor-Sonde ist am 3'-Ende methyliert, damit sie nicht als Primer wirken kann. Die Sonden binden in einem Abstand von 1-5 Basen an die Einzelstrang DNA, so dass der Donor in die Nähe des Akzeptors kommt und seine Fluoreszenzenergie nach UV-Anregung durch „Resonanz“ an den Donor transferieren kann (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Dieser strahlt dann Rotlicht ab, welches gemessen wird. Das Verfahren ist spezifisch für die Zielsequenz der HybProbes.

Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus der PCR gemessen; bei der SYBR-Green-Methode nach der Elongation, bei der HybProbe Methode nach der Annealing-Phase. Die Spezifität wird durch die Wahl der Annealing-Temperatur optimiert.

Mit Hilfe des LightCycler Auswerteprogramms wird die Fluoreszenzaktivität gegen die Zahl der Zyklen aufgetragen. Durch eine Regressionsgerade wird die Phase der

maximalen Amplifikation ermittelt; ihr Schnittpunkt mit der Zykluszahl ergibt den „crossing point“, der proportional zur DNA-Menge in der ursprünglichen Probe ist.

### 2.2.4 Real-time PCR der mitochondrialen DNS

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode richtete sich nach Angaben der Herrn Dr. Jonas (Medizinische Klinik II, Abteilung für Infektiologie) und Dr. Schüttler, die begonnen hatten, diesen Test aufzubauen.

Der Mastermix je Probe enthielt

4µl	Reaction Mix;
2.2 µl	Magnesiumchlorid;
1 µl	Primer sense;
2µl	10 mM Primer antisense;
3,4 µl	Wasser;
0,4 µl	SYBR-Green.

Zu diesen 13 µl/ Ansatz wurden 7 µl DNA Extrakt zugefügt. Für die Messung der Mitochondrien DNA wurde das Protokoll aus Tab. 4 angewendet.

Die PCR Reagenzien stammten aus dem Kit für SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Kat. Nr. 1 988 131, Roche Diagnostics, Mannheim.

Als Positivkontrolle und Standard für die Quantifizierung diente gereinigte, amplifizierte mtDNA in Verdünnungen von 1, 10, 100, 1000 und 10.000 copies pro 7 µl.

Tab. 4. Protokoll für die Messung der Mitochondrien DNA

Schritt	Zyklen		Temperatur [°C]	Heizgeschwindigkeit [°C/s]	Dauer [s]
Aktivierung	1		95	20	600
Amplifikation	45	Denaturierung	95	20	6
		Annealing	62-52 step size 1	20	7
		Elongation	72	5	13
		Fluoreszenzmessung	85	20	1
Schmelzen	1	Denaturierung	95	20	10
		Annealing	70	20	15
		Melting	70-95	0,05	0
Kühlen	1		40	20	60

### 2.2.5 Real-time PCR des H-ras

Jeder Ansatz enthielt einen Mastermix bestehend aus 4 µl Reaction Mix, 2,4 µl Magnesiumchlorid, 1 µl Primer sense; 2 µl 10 mM Primer as, 3,2 µl Wasser; 0,4 µl SYBR-Green. Zu diesen 13 µl/ Ansatz wurden 7 µl DNA Extrakt gegeben und das Protokoll von Tab. 5 angewendet. Die PCR Reagenzien stammten aus dem Kit für SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Kat. Nr. 1 988 131, Roche Diagnostics, Mannheim.

Tab. 5. Protokoll für die Messung der H-ras DNA

Schritt	Zyklen		Temperatur [°C]	Heizgeschwindigkeit [°C/s]	Dauer [s]
Aktivierung	1		95	20	600
Amplifikation	45	Denaturierung	95	20	6
		Annealing	62-51 step size 1	20	7
		Elongation	72	5	13
Schmelzen	1	Denaturierung	95	20	10
		Annealing	50	20	15
		Melting	50-95	0,1	0
Kühlen	1		40	20	60

### 2.2.6 Messung von CMV DNS im Zellüberstand

#### Magna pure Nukleinsäure Extraktion

Der Nachweis von CMV-DNA erfolgte mittels Real-Time-PCR im LightCycler nach einem Protokoll von Frau Dr. U. Friedrich (Institut für Medizinische Virologie, Gießen) datiert vom 15.09.2005, welches auf einer publizierten Methode aufbaute (SOMMER et al., 2005). Es handelt sich um PCRs mit Hybprobes. Es werden zwei Genombereiche (aus dem Glykoprotein-B-Bereich (*gB*) und aus dem Major intermediate early Gen (*mie*) in getrennten Ansätzen, aber mit demselben Protokoll in einem Lauf, amplifiziert. Die PCR wurde durch Vergleiche mit gereinigtem Amplifikat mit bekannter DNA-Konzentration geeicht.

Aliquots à 55 µl bzw. 110 µl (für 7,5 GE/ 10 µ) dieser Verdünnungen wurden abgefüllt und bei -80°C gelagert. Röhrchen zum kurzfristigen Gebrauch wurden bei -20 °C gelagert. Es wurde mindestens eine Standardreihe pipettiert. Die Konzentration  $7,5 \times 10^0$  GE / 10 µ wurd für beide Amplifikate zur Bestimmung der Empfindlichkeit

verwendet. Sie musste positiv sein, um eine Empfindlichkeit von 100 GE/ml zu erreichen.

### Primer und Hybprobes für die FRET PCR

Für diese PCRs wurde das Fast-Start–Kit (Roche) verwendet. MgCl<sub>2</sub> wurde in einer Endkonz. von 3mM verwendet. Hierzu wurde die 25 mM Lösung, aus dem Fast Start Kit vorverdünnt: 2,4 Teile MgCl<sub>2</sub>, 1,6 Teile H<sub>2</sub>O.

Für **gB** wurden alle Primer und Hybprobes gemischt, aliquotiert und bei – 20 °C aufbewahrt: 5 nMol gB–for in 500 µl; 5 nMOL gb-rev in 500 µl ; 2 x 1 nMol gB LC in 500 µl; 1 nMol gB FL in 250 µl; H<sub>2</sub>O 500 µl. Das Gesamtvolumen von 2250 µl wurde in 28 x 80 µl Portionen aliquotiert.

Für **mie** wurden Primer und Hybprobes getrennt aliquotiert und bei – 20 °C aufbewahrt. Die Lösungen wurden folgendermaßen angesetzt und anschließend nach dem Protokoll bearbeitet wie in Tab. 6 aufgeführt:

CM 1 s -10 µM ( 1 ml/ 10 nmol); CM 1 as- 10µM (1ml / 10 nmol); CM 1 F-8µM (125 µl / 1 nmol); CM 1 LR-8 µM (1 25µl/ 1 nmol)

Tab. 6 LightCycler-Protokoll für die CMV-Messungen

Schritt	Zyklen		Temperatur [°C]	Heizgeschwindigkeit [°C/s]	Dauer [s]
Aktivierung	1		95	20	600
Amplifikation	45	Denaturierung	95	20	6
		Annealing	64	20	7
		Elongation	72	5	13
Schmelzen	1	Denaturierung	95	20	10
		Annealing	50	20	15
		Melting	95	0,1	0
Kühlen	1		40	20	60

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Quantifizierung von mtDNA in Leukozyten**

##### **3.1.1 Nachweis der mtDNA bei HIV-Patienten**

Zunächst sollte die Anzahl der Mitochondrien pro Buffy-Coat in den Blutproben der Studienpatienten gemessen werden, um so auf mögliche toxische Wirkungen und Einflüsse einer ART schließen zu können. Die Anzahl Copies mtDNA pro Probe wurde durch Vergleich mit Verdünnungsreihen der gereinigten amplifizierten mtDNA bestimmt.

Es lagen 35 Proben von 13 Patienten vor. Bei Patient 01A01 fehlte die Probe bei 24 Wochen, bei Patient 01A02 die Proben bei 24 und 48 Wochen und bei Patient 01A03 die Probe bei 48 Wochen. Zu 27 der 35 Proben konnten stimmige Messwerte erhalten werden. Die mtDNA wurde nach dem angegebenen PCR-Protokoll gemessen. Es wurden zu jeder Messung jeweils 1:1, 1: 10 und 1:100 Verdünnungen des Buffy-Coat Extrakts eingesetzt und hieraus nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der arithmetische MW. ermittelt (Tabelle 7). Bei 17 Proben stimmten die Messwerte für die verschiedenen Verdünnungsstufen sehr gut bis noch befriedigend (unter einen halben  $\text{Log}_{10}$ -Stufe Unterschied, d. h. Faktor  $<3,17$ ) überein. Bei den initialen Messwerten für Patient 01C70 unterschieden sich 2 Messungen allerdings um mehr als eine halbe Log-Stufe (Faktor 3,17) und wurden daher nicht berücksichtigt. Auch die unplausibel niedrigen Messwerte der 1:100 Verdünnungen für Patient 01C63 nahe der Nachweisgrenze wurden nicht berücksichtigt. Für drei Proben lagen drei befriedigende Messwerte vor, bei 14 Proben zwei und bei 10 nur ein Wert. Die angegebenen Werte (MW) in der letzten Spalte von Tabelle 7 beziehen sich also sowohl auf Proben mit mehreren Messwerten, als auch auf Einzelwerte. Die Werte lagen zwischen 42 und 596 Mio. copies mtDNA pro Probe. Auf eine MW.-bildung wurde in Tab. 7 verzichtet, da die Messwerte auf die Zahl der H-ras copies bezogen werden sollten.

Tabelle 7. Anzahl der mtDNA-Moleküle in Buffy-Coat Proben von Patienten während einer 48 wöchigen HIV-Therapie.

Patient	Probe	vorhanden	Mito 1:10	Mito 1:100	Mito 1:1	Summe	Mito M
01B32	0	x			320.182.801	320.182.801	320.1
	24	x			140.614.142	140.614.142	140.6
	48	x			104.587.312	104.587.312	104.5
01C61	0	x	36.678.537	5.451.927		911.978.026	455.9
	24	x	49.605.862	6.786.987		1174757292	587.3
	48	x	16.203.693	2.243.365		386373459	193.1
01C63	0	x	13.567.005	3333		135.670.050	135.6
	24	x	16.203.693	2421		162.036.930	162.0
	48	x	13.647.560	3392		163.475.600	163.4
01C64	0	x	41.045.070	6.511.484		1061599133	530.7
	4	x	56.841.562	6.247.165		1193132149	596.5
	48	x	30.528.889	4.484.427		753731633	376.8
04C65	0	x	38.004.760	5.582.568	470.449.488	1408753865	469.5
	24	x	24.234.943	3.456.074	582.195.709	1170152511	390.0
	48	x	6.949.619	956.480	30.169.562	195313776	65.7
01C66	0	x	12.195.679	1.372.483		259205103	129.6
	24	x	34.366.159	4.843.173		827978913	413.9
	48	x	32.583.070	4.302.392		756069921	378.0
01C69	0	x	7.779.093		77.331.779	155122709	77.5
	24	x					
	48	x			86.027.242	86027242	86.0
01C71	0	x	32.390.750		174.014.325	497921825	248.9
	24	x	49.021.997		225.792.234	716012204	358.0
	48	x	20.411.880		138.959.102	343077902	171.5
01A01	0	x			171.966.163	171966163	171.9
	24	fehlt					
	48	x			183.537.157	183537157	183.5
01A02	0	x					
	24	fehlt					
	48	fehlt					
01A03	0	x			42028607	42028607	42.0
	24	x			207833236	207833236	207.8
	48	fehlt					
03A04	0	x					
	24	x					
	48	x					

Die rot markierten Werte wurden nicht berücksichtigt.

### 3.1.2 Standardisierung mit H-ras

Eine besondere Rolle spielt die Anfertigung des Buffy-Coats (s. Methodenteil). Hierdurch kann eine möglichst große Menge an Leukozyten gewonnen werden. Allerdings besteht ein Problem darin, dass die Menge des erlangten Leukozytenkonzentrats pro Probe sehr variiert, bzw. keine Standardisierung der

Methode aufgrund der hohen Variabilität der Leukozytenzahl von Patient zu Patient gegeben ist. Die gemessene Anzahl der Copies mtDNA ist für sich alleine also nicht aussagekräftig, um zuverlässige Schlussfolgerungen zu tätigen.

Es bestand also die Notwendigkeit eine Methode zu etablieren, mit der die Schwankungen der Leukozytenzahl in der Präparation korrigiert werden konnte.

Der Ansatz für diese Methode liegt in der Überlegung einen zweiten Wert zu ermitteln der jeweils sichere und genaue Informationen über die tatsächliche Zellzahl liefert.

Durch Messung des H-ras Gens, welches in jeder Zelle nur ein einziges Mal pro Chromosomensatz zu finden ist, ist dies gegeben. H-ras ist ein menschliches Gen welches ein Protein kodiert, das Zellteilung im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren reguliert. Das H-ras Protein ist eine GTPase, hat einen frühen Einfluß auf viele Signalvermittlungswege und ist meistens mit der Zellmembran assoziiert. Das H-ras Gen ist auf dem kurzen Arm (p) von Chromosom11 an der Position 15.5 vom Basenpaar 522,241 zum Basenpaar 525,549 lokalisiert.

Durch Messung der mitochondrialen DNA und Bildung eines Quotienten zur H-ras DNA besteht somit die Möglichkeit einer genaueren Beurteilung der Mitochondrienanzahl pro Zelle.

Um die Richtigkeit der Zellzahlbestimmung mit der H-ras PCR zu überprüfen, wurden zunächst 4 Proben an das Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Gießen zur Leukozyten-Quantifizierung gesandt (Tabelle 8). Die vier Patienten stammen aus dem Patientenkollektiv der Infektionsstation des Uniklinikums in Gießen. Bei Patienten 2 und 4 gab es eine sehr gute Übereinstimmung beider Messmethoden, bei den beiden anderen war der durch PCR ermittelte Wert etwa um den Faktor 2 zu niedrig. Angesichts der begrenzten Genauigkeit der qPCR ist diese Abweichung noch akzeptabel (siehe oben).

Tab. 8. Vergleich der Zellzahlbestimmung durch Zählung der Leukozyten und durch qPCR des H-RAS-Gens

Patient	Zellzählung im externen Labor	Ermittelter Wert (PCR)*	Crossing Point
1	18,9 x 10 <sup>9</sup>	11,3 x 10 <sup>9</sup>	24,34
2	19,1 x 10 <sup>9</sup>	19,5 x 10 <sup>9</sup>	23,73
3	20,9 x 10 <sup>9</sup>	9,8 x 10 <sup>9</sup>	24,50
4	23,4 x 10 <sup>9</sup>	25,3 x 10 <sup>9</sup>	23,44

\* Es wurden zu jeder Messung der H-RAS-Copies jeweils 1:1, 1: 10 und 1:100 Verdünnungen verwendet und hieraus nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der arithmetische MW. ermittelt.

Auf der Basis dieser Vorversuche zur Eichung mit H-ras wurden parallel zwei PCR-Mess-Serien mit der aus den Buffy-Coats extrahierten DNA für jeden Patient durchgeführt. Einmal wurde die mtDNA in Copies pro Zelle quantifiziert und ein weiteres Mal die Anzahl der H-ras Genkopien bestimmt. Durch die Messung der H-ras-Gene konnte die Zellzahl bestimmt werden und dann mit der gemessenen Mitochondrienanzahl korreliert werden. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der H-ras-Messungen. Es wurden zwischen 83.000 und 717.000 Genomkopien pro Probe gefunden

Tabelle 9. Werte der H-ras-Messung bei dem Patientenkollektiv

Patient	Probe	vorhanden	H-ras 1:10	H-ras 1:100	H-ras 1:1	Summe	H-ras MW
01B32	0	X			121890	121890	121890
	24	X			130092	130092	130092
	48	X			90125	90125	90125
01C61	0	X	24795	3842		632106	316053
	24	X	47553	6430		1118487	559243
	48	X	17280	3014		474163	237081
01C63	0	X	11350	3333		446773	223387
	24	X	13160	2421		373689	186844
	48	X	19452	3392		533762	266881
01C64	0	X	37085	5918		962665	481333
	4	X	19337	3313		524675	262337
	48	X	17589	2479		423779	211889
04C65	0	X	27421	7910	529147	1594333	531444
	24	X	19452	5712	650970	1416651	472217
	48	X	7910	2163	103885	399313	133104
01C66	0	X	17382	6468		820597	410298
	24	X	37749	10572		1434664	717332
	48	X	26307	7957		1058752	529376
01C69	0	X	56475		796114	1360864	680432
	24	X			5230618	5230618	5230618
	48	X			662634	662634	662634
01C70	0	X					
	24	X					
	48	X					
01C71	0	X			719893		
	24	X			582786		
	48	X			270878		
01A01	0	X			182304	182304	182304
	24	Fehlt					
	48	X			142172	142172	142172
01A02	0	X					

	24	Fehlt					
	48	Fehlt					
01A03	0	X			82957	82957	82957
	24	X			287583	287583	287583
	48	Fehlt					
03A04	0	X					
	24	X					
	48	X					

Der rot markierte Messwert wurde nicht berücksichtigt.

### 3.1.3 mtDNS/H-RAS-Verhältnis bei gesunden Individuen

Um zu überprüfen und zu vergleichen ob die Methode sinnvoll einsetzbar ist, wurden die Messungen bei einem Kollektiv von Gesunden durchgeführt (Tabelle 10). Für die mtDNA wurden Werte zwischen 19,8 und 126,4 Mio. copies pro Probe erhalten, also auffällig weniger als bei vielen HIV-Patienten. Die Variabilität der H-ras Werte zwischen 48 und 204 Tausend Genomkopien spiegelt die schwankende Ausbeute an Leukozyten im Buffy-Coat und die Notwendigkeit der Normierung der mtDNA-Werte über H-ras wider.

Tabelle .10. Copies mtDNA und H-RAS DNA bei 8 gesunden Probanden

Proband	mtDNA	H-RAS DNA	mt/H-RAS Verhältnis
1	77.331.779	61.338	1261
2	126.401.143	204.007	620
3	43.806.847	72.827	602
4	34.163.315	59.198	577
5	43.291.237	61.703	702
6	42.781.696	99.079	432
7	19.816.548	57.813	343
8	29.116.757	48.405	602

MW 642 ± 275 S.A.

Insgesamt liegen die H-ras-Werte bei der Gruppe der Gesunden aber viel niedriger als bei den HIV-Patienten (siehe oben) und auch die Schwankungen sind viel geringer. Das mt/H-ras-Verhältnis bei den Gesunden schwankt mit einem Variationskoeffizient von 43 % zwar relativ stark, aber doch viel weniger als die Einzelwerte. Wie sich die Standardabweichung (S.A.) des MW. aus der Ungenauigkeit der beiden PCR-Messungen und der biologischen Schwankung des

Mitochondriengehalts in Leukozyten bei gesunden Normalpersonen zusammensetzt, lässt sich aus den Daten nicht ableiten.

### **3.2 mtDNS/H-RAS-Verhältnis bei den HIV-Patienten**

Zu jedem Patienten existierten im Prinzip jeweils 3 Proben. Zunächst gab es die initiale Probe vor dem Therapiebeginn. Hierdurch ist die Möglichkeit gewährleistet, den Zustand des Patienten vor dem toxischen Therapieeinfluss zu bestimmen und eine eventuelle vorangegangene Schädigung, nicht durch ART, zu erkennen. Es muss hier berücksichtigt werden, dass womöglich eine mitochondriale Toxizität auch schon von vornherein durch den Befall der Zellen mit HIV gegeben sein kann.

Bei den Nullproben der Patienten wird oft ein deutlich höherer Mito/H-ras Quotient als im gesunden Vergleichskollektiv gefunden (rot in Tab. 10). Ein unplausibel niedriger Wert bei Patient 01C69 von Woche 24 ist wohl ein Ausreißer, da die Werte vorher und nachher nicht wesentlich vom sonstigen Wertespektrum abwichen. Die Werte schwankten zwischen 114 und 2627, der arithmetische MW war  $949 \pm 750$  copies pro Ansatz. Verglichen dazu lagen die Werte im Gesundenkollektiv zwischen 343 und 1261 mit einem MW von  $642 \pm 275$ . Die MW waren bei Gesunden und HIV-Infizierten im Welch-Test nicht signifikant unterschiedlich, die S.A. sind dagegen auffällig unterschiedlich.

### **3.3. mtDNA unter verschiedenen Therapieregimen**

Bei 4 der 13 Patienten lagen gar keine Messwerte zum mtDNA/H-ras-Verhältnis vor, bei 3 weiteren war die Verlaufsbeobachtung lückenhaft. Bei den restlichen 6 Patienten gab es kein einheitliches Muster (Tab. 11).

Der einzige Patient, der Schema B (D4T, 3TC und Kaletra) bekommen hatte, zeigte tatsächlich nach 24 Wochen Therapie einen mutmaßlich bedeutsamen Abfall der mtDNA um 59 %, was einem Unterschied von  $> 2$  S.A. entsprach. Danach fiel der Wert aber nicht weiter ab.

Drei Patienten, die Schema C erhielten (TFV, 3TC, Kaletra) zeigten tendenziell einen Abfall der Werte, drei weitere jedoch eine tendenzielle Zunahme. In keinem Fall unterschieden sich die höchsten und niedrigsten Werte eines Verlaufs um  $>2,25$ , meist deutlich weniger.

Dies galt auch für die 2 Patienten, die nach Schema A (D4T, 3TC, Kaletra) behandelt wurden und für die jeweils 2 Werte vorlagen.

Tab. 11. mtDNA/H-Ras-Verhältnis bei den HIV-Patienten im Verlauf. Patienten mit der Kennung A erhielten D4T+ 3TC+ Kaletra, mit B D4T+ 3TC+ Efavirenz, mit C TFV+ 3TC+ Kaletra.

Patient	Probe von Woche	Probe vorhanden	H-ras MW copies	Mito MW copies	Mito/H-RAS Verhältnis
01B32	0	X	121.890	320.182.801	2627
	24	X	130.092	140.614.142	1081
	48	X	90.125	104.587.312	1160
01C61	0	X	316.053	455.989.013	1443
	24	X	559.243	587.378.646	1050
	48	X	237.081	193.186.729	815
01C63	0	X	223.387	135.670.050	607
	24	X	186.844	162.036.930	867
	48	X	266.881	163.475.600	613
01C64	0	X	481.333	530.799.566	1103
	4	X	262.337	596.566.074	2274
	48	X	211.889	376.865.816	1779
04C65	0	X	531.444	469.584.622	884
	24	X	472.217	390.050.837	826
	48	X	133.104	65.104.592	489
01C66	0	X	410.298	129.602.551	316
	24	X	717.332	413.989.457	577
	48	X	529.376	378.034.961	714
01C69	0	X	680.432	77.561.355	114
	24	X	5.230.618	86.027.242	16
	48	X	662.634	86.027.242	130
01C70	0	X			
	24	X			
	48	X		286.235.901	
01C71	0	X		248.960.913	
	24	X		358.006.102	
	48	X		171.538.951	
01A01	0	X	182.304	171.966.163	943
	24	Fehlt			
	48	X	142.172	183.537.157	1291
01A02	0	X			
	24	Fehlt			
	48	Fehlt			
01A03	0	X	82.957	42.028.607	507
	24	X	287.583	207.833.236	723
	48	Fehlt			
03A04	0	X			
	24	X			
	48	X			

Die unplausiblen rot hinterlegten Werte wurden nicht berücksichtigt.

### 3..4 Messung von CMV-DNS in Lymphozyten

Durch die zusätzliche Messung von CMV in allen Proben (HIV-Patienten und Gesundenkollektiv), sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Toxizität bei HIV-Patienten, der HI-Viruslast und einem zusätzlichen CMV-Befall untersucht werden. Die Messung erfolgte sowohl im Serum als auch im Buffy-Coat, also für jeden Patienten zweimal (Tab. 12).

Tab. 12. CMV DNA im Patienten Serum sowie im Buffy-Coat (GE/PCR Ansatz) im Vergleich zur HI-Viruslast, dem T4/T8-Verhältnis und dem mt/H-ras-Verhältnis. Die Nachweisgrenze war 7,5 GE CMV DNA /Ansatz.

Patient		CMV Buffy	CMV Serum	HI-Viruslast	T4/T8	mt/H-ras
01C61	Baseline	neg.	neg.	183562	378/695	1443
01C61	24	58	neg.	<50	891/1540	1050
01C61	48	35	neg.	<50	720/730	815
01C63	Baseline	55	neg.	59946	31/878	607
01C63	24	9	neg.	<50	129/106	867
01C63	48	neg	16	<50	192/946	613
01C64	Baseline	423 (1411)	35 (70)	<50	139/1830	1103
01C64	24	neg.	neg.	<50	70/1159	2274
01C64	48	neg.	neg.	<50	89/1088	1779
04C65	Baseline	neg.	neg.	fehlt	fehlt	884
04C65	24	neg.	16	fehlt	fehlt	826
04C65	48	neg.	neg.	fehlt	fehlt	489
01C70	Baseline	68 (28)	243 (154)	44180	234/1807	fehlt
01C70	24	neg.	neg.	<50	187/781	fehlt
01C70	48	neg.	neg.	<50	155/637	fehlt
01C71	Baseline	51 (41)	243 (214)	460	306/985	fehlt
01C71	24	neg.	neg.	<50	295/575	fehlt
01C71	48	neg.	452	<50	669/1080	fehlt
01C75	Baseline	111 (47)	208 (333)	fehlt	fehlt	fehlt
01C75	24	neg. ml	neg. ml	fehlt	fehlt	fehlt
01C75	48	<100GE/ml	<100GE/ml	fehlt	fehlt	fehlt
01C77	Baseline	<100GE/ml	<100GE/ml	fehlt	fehlt	fehlt
01C77	24	<100GE/ml	<100GE/ml	fehlt	fehlt	fehlt
01C77	48	<100GE/ml	<100GE/ml	fehlt	fehlt	fehlt

Die CMV Messung ergab bei dem gesamten gesunden Kontrollkollektiv negative Werte. Bei dem Patientenkollektiv zeigen sich verschiedene Verlaufsbilder. Es scheint keinen klaren Zusammenhang zwischen der HI-Viruslast und dem CMV Befall zu geben.

Patient 01C61 zeigt bei der Baseline Messung eine sehr hohe HI-Viruslast ohne nachweisbaren CMV Wert. Im Verlauf sinkt die HI-Viruslast unter 50 während der CMV-Wert nun mit 58 im Buffy-Coat nachweisbar ist, aber nach 48 Wochen auf 35 abfällt. Patient 01C63 zeigt dagegen bei hoher initialer HI-Viruslast und sehr niedrigen T4 Zahlen auch einen messbaren CMV Befall von 55 im Buffy-Coat, welcher im Verlauf bei abgefallener HI-Viruslast in der 24 Wochenmessung auf 9 abfällt und in der 48 Wochenmessung gar nicht mehr nachweisbar ist.

Zwischen HI-Viruslast und mtDNA zeigte sich bei den 4 Patienten, bei denen entsprechende Daten vorlagen, keine eindeutige Beziehung. Patient 01C61 (s. Tabelle 11) zeigt bei hoher Viruslast etwas niedrigere mtDNA Werte als 24 Wochen nach Therapiebeginn. Nach 48 Wochen unter ART sinkt jedoch die mtDNA sehr stark auf unter 33% des vorherigen Werts ab. Dieses Schema finden wir auch bei Patient 01C71, hier fällt der mtDNA Wert auf 48 % des vorherigen Wertes. Patient 01C64 hat durchgehend eine Viruslast unter 50; hier ist der Baselinewert der mtDNA hoch, steigt nach 24 Wochen Therapie weiter an um ebenfalls in der 48. Therapiewoche deutlich abzufallen. Patient 01C63 zeigt initial bei hoher Viruslast zum Baselinezeitpunkt niedrigere Ausgangswerte der mtDNA, welche dann sowohl nach 24 als auch nach 48 Wochen der Therapie und Abfall der Viruslast unter 50 auf eine höhere mtDNA-Anzahl steigen und auf ähnlich hohem Niveau bleiben.

## **4. Diskussion**

### ***4.1 Bedeutung der NRTI-bedingten Mitochondrien Toxizität.***

NRTI's sind und bleiben die Eckpfeiler der HAART. Es ist bekannt, dass viele dieser Substanzen zahlreiche NWTen verursachen können, von denen einige vermutlich durch ihren negativen Einfluss auf die Mitochondrien verursacht sind.

Schon in Studien 1991 konnten Arnaudo E et al zeigen, dass Langzeit-Zidovudine (AZT) Therapien in HIV-Patienten destruktive mt-bedingte Myopathien mit histologischen Eigenschaften von Ragged-red fibres (RRF) und Proliferationen abnormaler Mitochondrien verursacht. Via Southern blotting konnten bei 9 AZT

therapierten Patienten mit dieser Myopathie erheblich reduzierte Mengen (bis zu 78% im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen) mtDNA in Muskelbiopsien gezeigt werden. Bei 2 HIV-Patienten, welche keine AZT Therapie erhalten hatten, war keine Differenz zu 4 Gesunden zu finden. Die Verringerung der mtDNA scheint reversibel zu sein, da ein Patient eine wesentliche Reduktion an RRF und einen begleitenden Anstieg an muskulärem mtDNA-Gehalt nach AZT-Abbruch zeigte. Mt-DNA Depletion ist somit wahrscheinlich durch AZT induzierte Inhibition der mtDNA Replikation durch DNA Polymerase gamma verursacht und nicht ein sekundärer Effekt der HIV-Infektion an sich.

Wegen der bakteriellen Herkunft der mtDNA-Polymerase gamma hat diese eine andere Empfindlichkeit gegenüber NRTI als die anderen zellulären DNA-Polymerasen. Da auch sich schnell teilende Zellen eine gewisse Zeit von ihrem Mitochondrien-Vorrat zehren können, zeigen sich die Funktionsausfälle erst nach mehreren Wochen oder Monaten. Zahlreiche klinische und in vitro Studien haben nahegelegt, dass NRTIs mit mitochondrialer Dysfunktion in verschiedenen Geweben auf unterschiedliche Weise im Zusammenhang stehen, so dass die Evidenz in vielen Fällen limitiert ist. Die unvorhersagbare Verteilung der Mitochondrien auf die Tochterzellen nach der Zellteilung erschwert es zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer Dysfunktion in einem bestimmten Gewebe vorherzusagen. Sowohl HIV-Infektionen an sich, als auch HAART können die Mitochondrienfunktion verändern, indem sie zu einer Verringerung der mtDNA-Menge oder zu Schäden in der mtDNA führen. Außerdem gibt es einen Schwelleneffekt für die Expression der mitochondrialen Dysfunktion in einem bestimmten Gewebe, sowohl auf mitochondrialer, als auch auf Zellebene (White AJ. et al., 2001). Mt-Toxizität ist mit vielen NWTen der ART-Behandlung assoziiert, jedoch kann nicht angenommen werden, dass alle NRTI Toxizitäten auf diesen speziellen Mechanismus zurückzuführen sind. Während Laktatazidose und Myopathie sehr wahrscheinlich mitochondrialer Natur sind, sind Neuropathien mit diesem pathophysiologischen Mechanismus nicht so eindeutig in Verbindung zu bringen. Anämie und Neutropenie scheinen eher ein direkter Effekt von AZT oder einem seiner Metabolite zu sein.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die Frage, wie die Mt-Toxizität die Indikation zur ART und die Wahl der Medikamente beeinflusst. Dies gilt in erhöhtem Maß für die Frage der perinatalen Prophylaxe für Kinder HIV-infizierter Mütter.

Angesichts der vielen Einflussfaktoren ist es nicht überraschend, dass es keine einheitliche Antwort auf die Frage gibt, mit welcher labordiagnostischen Methode die Mt-Toxizität möglichst schon vor dem Auftreten von klinischen Symptomen erkannt werden kann. Am naheliegendsten ist die Messung der mtDNA-Menge pro Zelle, aber die Messung von mt-Funktionen, z. B. der Atmungskettenenzyme, ist direkter mit den möglichen klinischen Symptomen assoziiert. Neben der Messung von Gesamtextrakten klinischer Proben ist auch die zytometrische Analyse des Anteils von Zellen mit mt-Schäden möglich und unter Umständen aufschlussreicher (Polo et al., 2003; Ferraresi R. et al., 2004).

Lopèz S et al., 2004 befassten sich mit den mitochondrialen Auswirkungen der ART bei asymptomatischen HIV-Patienten. Das Verhältnis mtDNA zu nukleärer DNA (mt/nDNA) hat gemäß diesen Autoren Akzeptanz als Marker für mitochondriale Toxizität bei HIV-infizierten Patienten gefunden, die funktionelle Bedeutung dieser Alteration sei jedoch unklar. Es wurde der mtDNA Gehalt, die Mitochondrien-Anzahl und -Funktion in PBMCs von asymptomatisch HIV-Infizierten Patienten bestimmt. Die ausgewählten Patienten erhielten eine first-line HAART für mindestens 6 Monate bestehend aus AZT plus 3TC oder Stavudine (d4T) plus Didanosine plus entweder Nelfinavir oder Nevirapine oder waren noch ohne Therapie. Der mtDNA Gehalt wurde per quantitativer real-time PCR (qPCR) bestimmt, die Mitochondrienzahl und Funktionalität mittels Zitratsyntheseaktivität, Enzymaktivität der Komplexe III und IV (beide mtDNA kodiert), der Elektronentransportkette mittels Spektrophotometrie, Sauerstoffkonsum durch Polarographie und oxidative Schäden in Zellmembranen durch cis-Parinar-Säure-Fluoreszenz-Monitoring. Bei der mtDNA Bestimmung wurden für jede Probe r18S als nukleäres Gen und ND2 als mitochondriales Gen separat durch qPCR quantifiziert, also im Prinzip ähnlich wie in der vorliegenden Dissertation. Die Mitochondrienzahl war bei allen behandelten Gruppen signifikant erniedrigt. Patienten welche mit D4T plus DDI behandelt wurden, hatten eine mtDNA Depletion und einen Abfall in Komplexaktivität IV. Sauerstoffkonsum und Lipidperoxidation waren dagegen in allen Gruppen nicht beeinflusst. Langzeit HAART kann also mitochondriale Anomalitäten in PBMCs induzieren, welche, zumindest bei asymptomatischen Patienten, nicht unbedingt zu funktionellen Anomalitäten führen müssen.

Um den Effekt von antiretroviralen Agenzien auf die mtDNA Synthese in vivo zu evaluieren, wurde die mtDNA peripherer Blutmonozyten (PBMCs) von HIV-infizierten

Patienten und einem gesunden Vergleichskollektiv longitudinal durch TaqMan qPCR gemessen (Miura et al., 2003). Die mtDNA Anzahl wurde als Verhältnis des chromosomalen b-Aktin Gens und des mtDNA/b-Aktin Gen-Verhältnisses der Probe genutzt um eine Standardkurve zu definieren. Die mtDNA Werte waren in dieser Studie bei HIV-1-Infizierten, noch nicht therapierten Patienten, im Gegensatz zu Gesunden signifikant reduziert. Die mtDNA Menge war nicht nur signifikant positiv mit der CD4 Zellzahl korreliert, sondern auch negativ mit der HIV-1-Viruslast. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen mtDNA und Änderungen in klinischen Parametern gefunden werden. Die Autoren hielten weitere Untersuchungen für nötig, um den Mechanismus, welcher zur mtDNA Reduktion führt, zu erkennen und den Wert der mtDNA-Messung in der Versorgung von HIV-1-Infizierter Patienten abzuschätzen.

Bei der vorliegenden Dissertationsarbeit zeigt sich ein gewisser Widerspruch zu dieser Arbeit von Miura et al., da die noch nicht therapierten Patienten eher höhere als niedrigere mtDNA-Werte hatten. Insbesondere war die Streuung der Werte bei den Patienten viel größer als bei den gesunden Vergleichspersonen. Dies spiegelt offensichtlich die unterschiedlichen Infektionsstadien der HIV-Patienten wider, bei denen viele noch eine Aktivierung des Immunsystems zeigen, andere schon eine beginnende Anergie.

Für die Beziehung zwischen Viruslast und mtDNA konnten sich in der vorliegenden Dissertationsarbeit folgende Daten erheben lassen: Es zeigte sich bei den 4 Patienten, bei denen aufgrund der Datenlage ein Verhältnis zwischen HI-Viruslast und mtDNA zu erkennen war, keine eindeutige Beziehung. Mit zunehmender Therapiedauer zeigte sich aber bei allen 4 Patienten eine Abnahme der mtDNA pro Zelle. Es handelt sich natürlich nur um ein sehr geringes Patientenvergleichskollektiv. Das überwiegende Bild spricht jedoch dafür, dass die mtDNA Anzahl vor Therapiebeginn schon durch den HIV-Befall an sich beeinträchtigt ist, sich dann nach Therapiebeginn etwas erholt, jedoch letztendlich durch die ART-verursachte Toxizität noch deutlich weiter herabfällt.

Gourlain et al., 2003 untersuchten mit qPCR die Menge der mtDNA in PBMCs und *subkutanem Fettgewebe*, um den Effekt der ART auf Mitochondrien zu untersuchen. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Kit wie in der Dissertation extrahiert. Nukleäre und mitochondriale Gene wurde amplifiziert um die Anzahl der

mtDNA Kopien pro Zelle bestimmt, wobei ein Plasmid mit dem cyt-b-Gen als Standard diente. Es wurden 8 untherapierte asymptomatische HIV-infizierte Patienten, 4 HIV-infizierte, die seit 6 Monaten unter HAART standen und 6 nicht infizierte Kontrollspender untersucht. Die mtDNA Quantifikation führte zu erstaunlich gut reproduzierbaren Ergebnissen, da der mittlere Abweichungskoeffizient angeblich nur 1,09% für Replikate von Proben betrug, die 10 mal im selben Testlauf liefen und 5,78% und 3,7% für entsprechende Replikate in 5 unterschiedlichen Läufen bei 1:100 und 1:1000 Verdünnungen. Das entspricht nicht der üblichen Laborerfahrung, auch nicht in dieser Arbeit. Der logarithmische Medianwert der mtDNA in PBMCs war bei gesunden Spendern 2,94, bei nicht therapierten HIV-infizierten 2,78 wobei diese im Mittel 1,93 log HIV-1 RNA Kopien/mL hatten. Während die DNA von PBMCs keine PCR-Inhibitoren enthielt, war für das subkutane Fettgewebe eine Extra-Behandlung nötig, da es viel Inhibitor enthielt. Die mtDNA Veränderungen in PBMCs zeigten sich relativ schnell, da nach sechs Monaten Therapie der Wert von 2,78 auf 1,98 log Copies/mL fiel. In der Dissertationsarbeit war dagegen erst nach 12 Monaten ein klarer Abfall zu sehen.

Die Auswertung der venösen Laktatspiegel und der mtDNA aus peripherem Blut unter ART führten Montaner et al., 2003 durch. Trotz der methodisch bedingten Ungenauigkeit und der hohen physiologischen Variabilität wollten sie nachweisen, dass venöse Laktatmessungen sinnvoll sind, um NRTI verursachte mitochondriale Toxizität zu erfassen. Sie bestimmten als mitochondriales (mt) Gen die Cytochrom c Oxidase Untereinheit I (CCOI) und als nukleäres (n) Gen die akzessorische Untereinheit der DNA-Polymerase gamma (ASPOLgamma). Das Verhältnis mt/nDNA wurde ermittelt und mit einem Kontrollpool von DNA gesunder, HIV-negativer Männer normiert. Mit Hilfe dieses Assays charakterisierten sie Veränderungen im mt/nDNA Verhältnis bei symptomatischen Patienten unter NRTI Therapie mit Hyperlaktatämie. Die Ergebnisse zeigten, dass symptomatische Hyperlaktatämie mit erniedrigten mtDNA/nDNA Verhältnissen assoziiert war; diese waren im Durchschnitt 69% niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. Ein statistisch signifikanter Anstieg des mtDNA/nDNA Verhältnisses konnte nach Therapieabbruch beobachtet werden. Bei Patienten, die nicht D4T einnahmen, blieb das mtDNA/nDNA Verhältnis stabil. Der Abfall im mtDNA/nDNA Verhältnis ging dem venösen Laktat-Anstieg voraus. Das mtDNA/nDNA Verhältnis war statistisch signifikant niedriger bei Patienten welche d4T-haltige Therapieregime einnahmen. Diese Ergebnisse deuten nach Meinung der

Autoren darauf hin, dass dieser Parameter frühzeitig eine klinisch relevante mt Dysfunktion erkennen könnte und auf seine klinische Wertigkeit geprüft werden sollte.

Die Quantifikation der mtDNA von Blutlymphozyten für das Monitoring ART-induzierter mitochondrialer Depletion bei HIV-1 infizierten untersuchten Petit et al. (2003). Die absolute mtDNA Kopienanzahl differierte ähnlich wie bei uns interindividuell sehr stark, daher führten sie eine longitudinale Studie durch, bei der die erste Probe vor Therapiebeginn zum relativen Vergleich mit folgenden Proben herangezogen wurde. MtDNA und nukleäre DNA pro Zelle wurden beide per qPCR Analyse in DNA Gesamtextrakten von 361 seriellen kryopräservierten PBMCs bestimmt. Diese stammten aus früheren Verlaufsstudien an 60 HIV-Infizierten vor und nach Gabe verschiedener Therapieregime. Auch hier wurde das mtDNA/nDNA Verhältnis durch separate Messung des humanen mt 12S RNA Gens und des humanen nukleären Betaglobin-Gens durchgeführt. Der mtDNA Gehalt war stabil oder zunehmend über Jahre der HIV-1 Infektion in unbehandelten Patienten (n=7). Mit diesem Quantifikationssystem zeigte sich signifikante Veränderungen in der mtDNA Kopienanzahl abhängig von der Drei-, Vier- oder Fünfachtherapiekombination; AZT + Zalcitabine + Ritonavir und AZT + 3TC + Didanosine führten zu mtDNA Depletionen bei jedem behandelten Patienten, während - erstaunlicherweise - keiner der 7 Patienten (d. h. 35 Proben) welche D4T+3TC+ IDV Kombinationen erhalten hatten, eine signifikante Veränderung der mtDNA-Menge zeigte. Bei 7 Patienten kehrte die mtDNA Kopienanzahl zu Werten vor Therapiebeginn zurück oder stieg noch höher ohne jegliche Therapieunterbrechung der ART-Kombinationen. Die mtDNA Anzahl reduzierte sich also regelmäßig bei der Gabe mancher, jedoch nicht aller, NRTI-Kombinationen. Dies und die gelegentliche Feststellung, dass der mtDNA Gehalt unter Therapie spontan zu den Anfangswerten zurückkehrt, relativieren nach Ansicht der Autoren die klinische Bedeutung des PBMC mtDNA Gehalts als Marker für die ART-induzierte mitochondriale Toxizität.

Generell lässt sich aus den Literaturdaten ableiten, dass nur eine longitudinale Verlaufsbeobachtung der mtDNA-Menge sinnvoll ist, da es schon bei unbehandelten HIV-Patienten nicht so etwas wie einen Normalwert gibt. Dieses Prinzip wurde auch bei unserer Arbeit angewandt. In der Rockstroh-Studie, welche der vorliegenden

Dissertation zu Grunde liegt wurden die Patienten an 3 verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dies hatte einerseits das Ziel, eine Verlaufsbeobachtung mit vertretbarem Aufwand zu ermöglichen und andererseits auch die interindividuelle Schwankung der mtDNA bei den einzelnen Patienten zu berücksichtigen. In der Tat zeigte sich eine hohe Schwankungsbreite bei der mtDNA-Anzahl der HIV-infizierten. Es fiel vor allem auf, dass die mtDNA Werte beim gesunden Kontrollkollektiv deutlich niedriger lagen als bei vielen HIV-Patienten. Bei den Anfangswerten fiel überwiegend ein höherer mt/nDNA Quotient auf als im Vergleichskollektiv.

Während die Effekte der NRTI auf die mtDNA in klinischen Studien heterogen waren, konnten verschiedene Studie zeigen, dass eine Unterbrechung der Therapie signifikante Anstiege der mtDNA in CD8-T-Zellen bereits nach 6 Monaten bewirkt [MUSSINI et al 2005]. Eine *kürzere* Unterbrechung der Therapie durch den Patienten oder den behandelnden Arzt führt aber zu keiner mtDNA Erholung und zu keiner Verringerung der HAART-bezogenen Toxizität. Die Studie von Fernandez Guerrero et al 2005 zeigte, dass bei einzelnen asymptomatischen HIV-Patienten eine Unterbrechung der HAART über längere Zeiträume möglich ist, ohne dass es hierbei zu Problemen für den Patienten kommt.

Die Studie von Cossarizza et al., 2003 beurteilte den mtDNA Anteil in CD4 und CD8 Lymphozyten im peripheren Blut bei HIV-infizierten Patienten mit HAART welche verschiedene Fettstoffwechselstörungen aufwiesen. Die Lymphozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll angereichert, und mit Hilfe von Ak-beladenen magnetischen Teilchen weiter gereinigt und in CD4 bzw. CD8 Zellen aufgetrennt. Die mtDNA wurde ebenfalls per qPCR gemessen. In der ersten Reaktion wurde das mt/nDNA Verhältnis quantifiziert mit Hilfe des Promega PCR Kits und einer TaqMan Probe. Der Variationskoeffizient des Assays, gemessen in einer Serie von Experimenten, in der die Proben in 10 verschiedene Röhrchen aliquotiert wurden, jede unabhängig dreifach analysiert auf mtDNA und nDNA, lag bei ca. 10%. Bei Patienten mit LD zeigte sich überraschenderweise eine signifikante *Erhöhung* der mtDNA in CD4 und CD8 Zellen unabhängig von einer HIV-Infektion. Auch zeigte sich kein Unterschied beim Vergleich der HIV-positiven Patienten, die mit D4T oder AZT therapiert wurden, bzw. zwischen D-drugs und nicht D-drugs einnehmenden Patienten. Patienten mit Fettansammlungen hatten generell signifikant höhere mtDNA Anteile in den CD4 und auch CD8 Blutlymphozyten. Die Autoren kamen zu

dem Ergebnis, dass der relativ hohe mtDNA Gehalt bei LD Patienten, sowie die Korrelation zwischen mtDNA Anteil und Cholesterin bei allen HIV-positiven Patienten die Involvierung der Mitochondrien in diese Pathologie nahelegen. Sie kamen jedoch zu dem Schluss, dass weitere Studien nötig sind, um diese anfänglichen Beobachtungen zu bestätigen und sich zu vergewissern, ob die Quantifizierung der mtDNA in peripheren Lymphozyten ein sinnvoller und verlässlicher Marker ist, um HAART-abhängige Veränderungen der Fettverteilung im Verlauf feststellen zu können und eine Methode des Monitorings zu erhalten.

Die erheblichen Unterschiede bei den Ergebnissen der klinischen Studien könnten zum Teil auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen sein. Thrombozyten sind eine typische Quelle der Verfälschung bei der Quantifikation des mtDNA Gehalts in humanen PBCs mittels q PCR. Die meisten Studien benutzen Thrombozytenhaltige PBMC Fraktionen, um den mtDNA Gehalt pro Zelle zu bestimmen, ohne zu bedenken, dass Thrombozyten zwar Mitochondrien, aber keine Zellkerne enthalten und somit das mtDNA/nDNA Verhältnis erheblich verfälschen. Banas B. et al. 2004 führten eine sehr erhellende Studie durch, in der sie die störenden Thrombozyten total entfernten. Sie untersuchten Blutproben einer gesunden Kontrollgruppe G1, therapie-naive HIV-Patienten G2 und HIV-Patienten unter HAART G3 und maßen das mtDNA/nDNA-Verhältnis per qPCR. Mit DNA-Extrakten aus Vollblut war das mtDNA/nDNA Verhältnis in allen untersuchten Gruppen gleich. Vergleich man dieses Verhältnis bei Thrombozyten-freien PBMCs zeigten G1 und G2 im Vergleich eine Differenz von 22% und eine noch stärkere Reduktion von 40% im Vergleich von G1 mit G3. Vergleich man Vollblut-DNA-Extrakte mit PMBC-Extrakten, ergab sich in Gruppe G2 ein Unterschied im mtDNA/nDNA Verhältnis von 26%, mit Thrombozyten-freien Blutproben eine deutlichere Reduktion von 32% und mit Thrombozyten-freien PBMC Proben eine 42%ige Reduktion. Weiterhin ergab sich in der Analyse jedes einzelnen Patienten in Beziehung zu den unterschiedlichen Methoden eine geringere Fluktation, wenn thrombozytenfreie PBMCs für die qPCR verwendet wurden. Benutzt man nun Thrombozyten-freie Proben für die mtDNA Gehaltbestimmung, zeigt sich eine Korrelation eines niedrigen mtDNA/nDNA Verhältnisses zu klinischen Symptomen, wie erhöhte Laktatspiegel oder LD. Diese Daten zeigen, dass der erste Schritt der Probensammlung vor DNA-Extraktion sehr wichtig für die Richtigkeit der mtDNA Messung via PCR ist. Eine einfache und preiswerte Alternative zur teuren Eliminierung der störenden Thrombozyten ist der Gebrauch von Serumröhrchen für

die Blutgewinnung. Nutzt man Thrombozyten-freie PBMC Fraktionen um den mtDNA Gehalt zu bestimmen, so kann dieser ein bedeutender Marker für durch HAART verursachte klinische Symptome sein. Aus diesem Grund führten wir unsere Messungen aus DNA-Extrakten nach Anfertigung des Buffy-Coats durch und verwendeten Serumröhrchen für die Probensammlung.

Der Effekt des HIV auf die mtDNA und andere mitochondriale Parameter wurde von Mirò O. et al., 2004 in Dichtegradient-gereinigten (mutmaßlich Thrombozyten-armen) PBMCs von 25 asymptomatischen, nicht ART therapierten HIV-infizierten Patienten und von 25 Gesunden Blutproben untersucht. Die HIV-infizierten zeigten eine signifikante Erniedrigung im mtDNA Gehalt und in der Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenenzyme (MRC) Komplex II, MRC Komplex III, MRC Komplex IV und der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase zusammen mit der Lipid-Peroxidation der PBMC-Membranen. Daher ist eine HIV-infektion nicht nur mit mtDNA Depletion assoziiert, sondern auch mit einer extensiven Störung der Atmungskette und zunehmendem Sauerstoffschaden.

Chiappini F. et al., 2004 analysierten die Bedeutung der mtDNA als Marker mitochondrialer Toxizität in einer recht großen Kohorte (N=157) HIV-infizierter ambulanter Patienten während klinischer Evaluation. Wie üblich wurde die qPCR herangezogen um den mtDNA Gehalt im Verhältnis zur nDNA in PBMCs zu bestimmen. Hierzu wurden das mt Gen Cytochrom b und das n Gen b-actin separat bestimmt. Das mtDNA/nDNA Verhältnis war signifikant niedriger bei beiden HIV-infizierten Gruppen (13 Therapie-naive und 144 unter HAART) als in der Kontrollgruppe (30 HIV-negative). Keine signifikante Differenz konnte dagegen zwischen den therapierten und den naiven HIV-infizierten nachgewiesen werden. Die Laktatämie war bei der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei den therapierten HIV-Patienten. Triglyceride waren signifikant höher bei HAART therapierten Patienten im Vergleich zu nicht therapierten. Klinische Symptome der LD wurden bei 62 HAART-Therapierten beobachtet. Diese Symptome waren aber nicht mit einem anormalen mt/nDNA Verhältnissen oder Plasma TG Konzentrationen assoziiert. DDI/D4T therapierte Patienten zeigten ein niedrigeres mtDNA/nDNA Verhältnis als AZT/3TC einnehmende Patienten. Insgesamt gab es keine erkennbare Beziehung zwischen dem mtDNA/nDNA Verhältnis in PBMCs und klinischen Symptomen oder Laktatspiegeln. Das mtDNA/nDNA Verhältnis in Leukozyten ist daher nach

Auffassung der Autoren kein akkurater Marker für milde und/oder lang andauernde mitochondriale Toxizität. Jedoch ist anzumerken, dass die Autoren PBMCs ohne Thrombozytendepletion verwendet haben, was möglicherweise deutlichere Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen verschleiert haben mag.

Unabhängig von den genannten methodischen Problemen der mtDNA-Bestimmung wurde die fehlende Korrelation zwischen dem mtDNA-Gehalt in PBMC und der mitochondrialen Schädigung in Geweben von Maagaard A. et al., 2006 aufgezeigt. Sie maßen die mitochondriale Toxizität in der Skelettmuskulatur untherapierter HIV-Patienten, NRTI behandelter HIV-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe und verglichen diese Daten mit mt/nDNA aus PBMCs. Hierfür wurden Muskelbiopsien entnommen und per TaqMan realtime PCR System auf mtDNA und nDNA untersucht. Zusätzlich wurde durch Langstrecken PCR geprüft, ob die mtDNA Deletionen enthält und ob die Muskelfasern einen erniedrigten Gehalt an Cytochrom c Oxidase (COX) aufwiesen. Das mt/nDNA Verhältnis in Muskeln NRTI behandelter HIV-Patienten war verglichen zur gesunden Kontrollgruppe verringert. Mt-DNA Deletionen waren häufiger bei NRTI behandelten HIV-Patienten als bei Untherapierten und Gesunden. Ebenso zeigten HIV-Patienten unter Therapie mehr COX-defiziente Muskelfasern. COX-defiziente Fasern korrelierten mit mtDNA Depletionen. Patienten unter DDI hatten häufiger mtDNA Deletionen und COX-defiziente Fasern als therapierte Patienten ohne DDI-Einnahme. Besonders bemerkenswert ist der Befund, dass die mitochondrialen Alterationen in keiner Gruppe mit dem mtDNA-Gehalt pro Zelle in PBMCs korrelierten. Die sehr überzeugende Studie stellt die Bedeutung der mt/nDNA Bestimmung im peripheren Blut als klinisch relevanten Marker für mitochondriale Toxizität ernstlich in Frage.

Ähnliche Befunde waren bereits einige Jahre früher von Vittecog D. et al 2002 mit diagnostischen Methoden erhoben worden, die ursprünglich für mitochondriale Erbkrankheiten entwickelt wurden. HIV Patienten unter langfristiger ART, welche über verschiedene, nicht durch HIV erklärbare Symptome klagten, zeigten signifikante Zeichen einer mitochondrialen Beeinträchtigung, wie Laktatakkumulation im Blut und Liquor, muskuläre mitochondriale morphologische Alterationen und biochemische Defekte in Leber und Muskel, wobei die mtDNA als Hauptziel des toxischen Mechanismus anzunehmen war. Es wurden multiple Deletionen der muskulären mtDNA und eine Reduktion der muskulären und/oder Leber mtDNA

Kopienanzahl in einer Mehrheit der Patienten gefunden. Im Gegensatz zu Muskel und Leberzellen zeigten die PBMC keine signifikanten biochemischen oder genetischen Alterationen der Mitochondrien.

Garrabou G. et al., 2009 verglichen verschiedene Methoden zur Beurteilung der Mitochondrien bei HIV-infizierten Patienten, die eine Hyperlaktatämie entwickelt hatten. Es wurden Lymphozyten und Monozyten von HIV-Patienten unter HAART mit Hyperlaktatämie entnommen, von solchen die keine Hyperlaktatämie zeigten, von untherapierten HIV-infizierten und von einer gesunden Kohorte. Die Menge der mtDNA und mtRNA wurde mit qPCR gemessen, die Menge der translatierten mt Proteine per Western Blot und die Funktionstüchtigkeit der Atmungskette durch Aktivitätsspektrophotometrie der Komplexe III und IV bestimmt. Die mitochondrialen Parameter waren während der Hyperlaktatämie allesamt erniedrigt und besserten sich dann wieder. Die Nukleinsäuremessungen ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede. Signifikante Unterschiede gab es dagegen bei den mitochondrialen Proteinen und mehr noch bei der Aktivität der mitochondrialen Komplexe III und IV. Nach Besserung der Hyperlaktatämie kehrten diese wieder auf das Niveau HIV-therapierter ohne Hyperlaktatämie zurück, welches aber immer noch niedriger lag als bei Therapie-naiven oder gesunden Kohorten. Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette zeigte eine bessere Korrelation mit den Laktatspiegeln als die mitochondriale Nukleinsäureanalytik, so dass letztlich der mtDNA Gehalt diesen Autoren wenig bedeutsam erscheint.

Eine besonders wichtige Frage ist, ob die mt-Diagnostik überhaupt bei Therapie-Entscheidungen hilfreich sein kann. Die Effekte des Therapiewechsels zu Enfuvirtide, Tenofovir und Squinavir/Ritonavir bei ART erfahrenen Patienten auf deren Stoffwechsel und die Mitochondrien wurde von Mirò et al., 2006 untersucht. Es wurden 6 HAART erfahrene Patienten verfolgt, welche mindestens einen dideoxy-NRTI gegen Enfuvirtide plus Tenofovir plus Squinavir/Ritonavir (T20+TDF+SQV/r) ausgetauscht erhielten. Blutproben wurden zu Beginn, 12 und 24 Wochen nach dem Wechsel entnommen und Viruslast sowie CD4+ Lymphozytenzahl bestimmt. Metabolische Parameter wie Cholesterin, Glucose, Insulin, C-Peptid und Laktat wurden ebenfalls gemessen. Zur Charakterisierung der Mitochondrien wurde die mtDNA-Menge, die COX II Proteinexpressionsrate, die Aktivität der Atmungskettenkomplexe III und IV und der Sauerstoffkonsum der PBMCs bestimmt.

Als Vergleich dienten 6 untherapierte HIV Patienten. Die umgestellten Patienten zeigten einen mittleren Anstieg von 26 CD4+T Zellen/mm<sup>3</sup> und einem mittleren Abfall von 1,1 log der Viruslast. Laktat, Lipide und Glykämie blieben während der Studie stabil, nur der Insulinspiegel stieg etwas an. Die umgestellten Patienten zeigten zu Beginn niedrigere mitochondriale Parameter, die Unterschiede waren aber nur signifikant für Komplex III und IV Aktivität im Vergleich zu den untherapierten Patienten. Der mtDNA Gehalt stieg nicht signifikant während der Studie. Jedoch zeigte sich ein Anstieg der mitochondrialen Proteinsynthese, der Komplex III und IV Aktivität und des Sauerstoffkonsums. Die Therapieumstellung von HAART mit dideoxy-NRTIs zu T20 + TDF+SQV7r änderte zwar die Stoffwechselfparameter nur wenig, zeigte aber einen positiven Effekt auf die mitochondrialen Funktionen nach 24 Wochen.

Als das am stärksten toxisch auf die Mitochondrien wirkende HIV- Medikament gilt in den meisten Studien D4T. Die Hypothese von Gerschenson M. et al., 2009 lautete, dass Lipidprofil und Marker mitochondrialer Funktionen sich bei lipoatrophischen HIV-Patienten nach einem Therapieswitch auf Tenofovir bessern würden. Das Therapieregime wurde bei 10 Patienten, welche seit über 6 Jahren mit D4T therapiert wurden, für 48 Wochen auf Tenofovir umgestellt. Subcutane Fettgewebsbiopsien, Stoffwechselftests, HIV-Viruslast, CD4-Zellzahlbestimmung und DEXA-Scans wurden zu Studienbeginn und erneut nach 48 Wochen bestimmt und durchgeführt. Mt-DNA und mitochondriale Morphologie wurden in Fettgewebsbiopsien, mtDNA, 8-Oxo-Deoxoguanin in PBMC und Glutathion (GSH) sowie F2-Isoprostan im Plasma untersucht. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass systemische und periphere Fett-Mitochondrienwerte sich unter Therapiewechsel, trotz langjähriger vorangegangener D4Ttherapie, bei bleibender PI Gabe besserten.

Maagaard und Kvale et al., 2009 befassten sich in einer Übersichtsarbeit eingehend mit der Vielschichtigkeit der mitochondrialen Toxizität bei HIV-Infizierten. Diese ist einerseits durch ART hervorgerufen, lässt sich jedoch zunehmend auch bei untherapierten Patienten beobachten. Meist wurde die mtDNA Quantifikation als Nachweis mitochondrialer Toxizität bei HIV-infizierten benutzt. Jedoch ist die funktionelle und damit klinische Signifikanz von mtDNA Veränderungen, wie z. B. der numerische Verlust bezogen auf MD.nicht immer eindeutig. Die Pathogenese der NRTI-induzierten mt Toxizität wurde zunächst durch die Inhibition der DNA-

Polymerase gamma erklärt. Zum einen hemmen diese Wirkstoffe die Inkorporation der normalen Nukleotide in die mtDNA, zum anderen bewirken die eingebauten NRTI einen Kettenabbruch. Dies führt mit der Zeit zu einem verringerten Gehalt an mtDNA pro Zelle und zusätzlich zu mtDNA-Varianten mit Deletionen oder Mutationen. Deletionen könnten erklären, dass eine verringerte mtRNA Menge ohne begleitende mtDNA Depletion beobachtet wurde. Umgekehrt konnten trotz reduziertem mtDNA Gehalt sowohl in PBMCs als auch Geweben normale Mengen mitochondrial kodierter mRNAs und Proteine nachgewiesen werden, was eventuell auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen ist. Der mtDNA-Gehalt kann sogar in PBMCs unverändert sein, während er in spezifisch geschädigtem Gewebe reduziert ist. Einen starken Einfluss auf dieses heterogene Geschehen haben die Thymidinkinasen TK1 im Cytoplasma und TK2 in den Mitochondrien, die auch D4T und AZT phosphorylieren. TK1 fehlt in sich nicht teilendem Gewebe wie Muskeln, Fett und Neuronen, sodass hier TK2 für die Replikation der mtDNA erforderlich ist und zugleich auch die NRTI in Mitochondrien besonders wirksam macht. Diese komplexen Zusammenhänge machen es verständlich, dass gegen jede Intuition die mtDNA Menge in PBMCs keinen klaren Bezug zu den klinisch beobachteten NWN der NRTI-Therapie haben kann. Dazu kommt noch, dass HIV selbst eine Vorschädigung der mtDNA bewirken kann und in der Therapiephase dann möglicherweise die mitochondriale Toxizität der NRTI noch erhöht. Insgesamt halten die Autoren die Relevanz einer longitudinalen Abschätzung des mtDNA Gehalts bei zunächst unbehandelten Patienten, nach Therapiebeginn auch im Jahr 2009 noch nicht für ausreichend belegt.

Einsiedel L. et al., 2010 befassten sich mit mitochondrialen Dysfunktionen in CD4+ Zellen von D4T-therapierten HIV-Patienten. D4T wird immer noch häufig verwendet, vor allem in ressourcen-limitierten Ländern. Es erschien den Autoren untersuchenswert, ob eine beeinträchtigte mitochondriale Atmungskette in peripheren Blutlymphozyten eine NRTI-verursachte NW ist. CD4+ PBLs wurden von asymptomatischen, für 3 Monate mit D4T therapierten HIV-Infizierten isoliert (n=10), sowie von untherapierten HIV-Patienten (n=9) und von einer gesunden Kontrollkohorte (n=18). Der basale Sauerstoffkonsum der CD4+PBLs D4T-behandelter Patienten war relativ zu unbehandelten HIV-Patienten und der Kontrollkohorte reduziert. Die Zitratsyntheseaktivität, das relative mitochondriale Volumen (per EM) und mtDNA/nDNA Verhältnis zeigten dagegen keinen Unterschied

zwischen den Gruppen. Wegen der Entfernung der Thrombozyten dürften die Messungen der mtDNA mutmaßlich korrekt gewesen sein. Dass dennoch keine Unterschiede in der mtDNA-Menge gefunden wurden, lässt am Wert dieses Parameters in PBMCs und deren Subfraktionen erneut zweifeln. Aber einen Einfluss der HIV-Infektion selbst auf die Atmungskette fanden die Autoren auch nicht.

Obwohl HIV-Infektion und ART den mtDNA-Gehalt und die mtDNA-Funktion beeinflussen, sind umfassende Evaluierungen der Effekte auf Mitochondrien in der Muskulatur, im Fettgewebe und in Blutzellen nur begrenzt vorhanden. Die Gruppe von Morse et al., 2012 führte daher mtDNA-Quantifikationen, mtGenom-Sequenzierungen und Genexpressionsanalysen in den o.g. Geweben untherapierter HIV-infizierter (N=17), HIV-positiver unter ART (N=29) und bei einer HIV-negativen Kontrollkohorte (N=15) durch. Zehn der behandelten Patienten hatten eine LA, 8 eine periphere Neuropathie. Das mtDNA/nDNA-Verhältnis wurde durch separate qPCR des mtGens COX1 und des nGens  $\beta$ -Globin mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer bestimmt. Im *Fettgewebe* war das mtDNA/nDNA-Verhältnis ( $r$ ) bei unbehandelten HIV-Infizierten erhöht ( $r=353$ ), bei therapierten dagegen reduziert ( $r=161$ ) verglichen zur Kontrollgruppe ( $r=255$ ,  $P<0,05$  für beide Vergleiche). Der Unterschied zwischen beiden HIV-Infizierten-Gruppen war hoch signifikant ( $P=0,002$ ). Bei den Patienten, die mit Thymidinanaloga (N=12,  $r=122$ ) oder D-Drugs (N=6,  $r=63$ ) behandelt wurden, war  $r$  am niedrigsten, während es bei den Patienten ohne diese Medikation ( $r=243$ ) normal war. Bei den HIV-infizierten Teilnehmern korrelierte das mt/nDNA-Verhältnis im Fettgewebe mit dem Aktivierungslevel (CD38+/HLA-DR+) der CD4+ und CD8+ Lymphozyten. In der *Muskulatur oder den PBMCs* aller drei Gruppen wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede des mtDNA-Gehalts gefunden. Es gab auch keine Korrelation von  $r$  in allen 3 Geweben zu den Serum-Laktatspiegeln oder zur Neuropathie. Deletionen der mtDNA wurden nicht gefunden. Eine explorative DNA-Microarrayanalyse unter Einschluss Adipozyten-spezifischer Gene identifizierte eine unterschiedliche Genexpression zwischen den Patientengruppen. Auch diese sehr aktuelle, methodisch anspruchsvolle Arbeit relativiert die Aussagekraft der meisten früheren Arbeiten, die sich ausschließlich auf PBMC konzentriert haben.

#### **4.2 Alternative Methoden der Mt-Toxizitätsmessung**

In der Studie von Polo et al., 2003 wurde in peripheren Blutlymphozyten (PBL) von HIV-Infizierten der Anteil von Zellen mit mitochondrialer Dysfunktion (PBLmd) durch

Flow-Zytometrie gemessen und der Zusammenhang mit Blutlaktatspiegeln, dem klinischem und virologischem Status und den unterschiedlichen NRTI basierten Therapien geprüft. Bei HIV-Infizierten wurde mit 2,2 % eine höhere Prozentzahl an PBLmd als im gesunden Vergleichskollektiv (1,2 %) gefunden. D4T-beinhaltende Therapien zeigten mit 3,0 % den höchsten PBLmd Anteil, während mit AZT Behandelte niedrigere Werte (0,9 %) zeigten. Eine signifikante negative Korrelation wurde zwischen PBLmd und der CD4+ Zellzahl nachgewiesen. Bei Patienten mit AIDS waren die PBLmd ebenfalls höher als bei HIV-Positiven ohne AIDS. In der multivariaten Analyse waren der Gebrauch von D4T und die CD4+Zellzahl <200/microl unabhängige Prädiktoren einer hohen PBLmd Prozentzahl. Die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der PBL erkennbare Schäden der Mitochondrien aufweist, könnte zum Teil erklären, dass viele Studien, die die PBL oder PBMC pauschal messen, keine Unterschiede finden.

Eine grundsätzlich andere Methode wurde durch Milazzo L. et al., 2005 zur Bestimmung der NRTI verursachten mitochondrialen Toxizität *in vivo* verwendet. Der <sup>13</sup>C-Methionin Atemtest untersucht die mitochondriale hepatische Oxidationskapazität in Patienten. HIV infizierte Patienten unter ART mit normalem Serumlaktat hatten eine geringere <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Ausatmung als die gesunde Kontrollgruppe. HIV Patienten mit Hyperlaktatämie hatten noch niedrigere Werte. Dieser nicht-invasive <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Atemtest zeigt also möglicherweise den mitochondrialen Schaden bei ART-therapierten HIV Patienten, besonders bei Hyperlaktatämie.

Ähnliche Ergebnisse zum <sup>13</sup>C-Methionin Atemtest wurden von Banasch et al., 2008 publiziert. Diese bestätigen im Prinzip die bereits o.g. Ergebnisse. Die Studie besagt, dass untherapierte und mit D-Drugs therapierte Patienten oft niedrige Atemtest-Werte haben.

Sternfeld T. et al., 2009 analysierten, ob die Makrozytose roter Blutzellen (MCV) ein Marker mitochondrialer Toxizität bei ART-therapierten HIV-Patienten sein könnte. Mit Hilfe des <sup>13</sup>C-Methionin Atemtests wurde *in vivo* die hepatische mitochondriale Funktion bei ART-therapierten HIV-infizierten Patienten mit Makrozytose bestimmt. Das MCV war signifikant negativ mit den <sup>13</sup>C-Methionin Atemtest-Ergebnissen korreliert.

MD. führt auch zu Störungen im Glucosestoffwechsel und in deren Gefolge zu einer

L-Laktat Akkumulation. Ein neuer Aspekt war daher die Hypothese, dass ein oraler Glucosetoleranztest (OGTT) zur Detektion mitochondrialer Toxizität bei Patienten unter ART eingesetzt werden könnte. Hofstede et al., 2007 führten einen OGTT bei 30 Personen durch. Laktat wurde zu Beginn, 60 min und 120 min nach Glucosegabe gemessen. An allen Messzeitpunkten waren die Laktatspiegel bei den HIV-Patienten unter HAART höher als bei der Kontrollgruppe. Laktatspiegel über der oberen Normgrenze von 1800 micromol/L wurden als Indikator für mitochondriale Toxizität mit einer Sensitivität und einer Spezifität von 57% und 81% gewertet. Man kann also erwägen einen OGTT als eine zusätzliche Untersuchung bei symptomatischen Patienten zur Feststellung mitochondrialer Toxizität durchzuführen.

Zytosolische Deoxycytidinkinase (dCK), cytosolische Thymidinkinase (TK1), mitochondriale Thymidinkinase (TK2), Deoxyguanosinekinase (dGK) und 5'-Deoxynucleotidase (5'-dNT) sind Enzyme, die die Bildung intrazellulärer und intramitochondrialer Nukleotide kontrollieren. In der Studie von Rylova et al., 2007 wurde die mRNA Menge und die Aktivität dieser Enzyme mittels RT-PCR und selektivem Enzym-Assay in Mäusegeweben bestimmt. TK1 Aktivität wurde eindeutig nur in Milz und Testes nachgewiesen, während TK2, dGK und dCK Aktivität in allen Geweben nachgewiesen werden konnten. Die dGK Aktivität war höher als jede andere dNK in allen Geweben, außer in Milz und Testes. In der Skelettmuskulatur waren die dGK Aktivität 5-fach niedriger, die TK2 und dCK Mengen 10 fach niedriger im Vergleich zu anderen Geweben. Die Variation in der 5'-dNT Aktivität war ca. 8fach erhöht, mit den höchsten Werten im Gehirn und den niedrigsten im braunen Fett. Die Deoxynucleotide lagen in Muskeln 5-10 fach niedriger im Vergleich zu anderen nicht proliferierenden Geweben und 100 fach niedriger verglichen zur Milz. Diese Ergebnisse können dabei helfen, die gewebsspezifische Toxizität der Nucleosidanaloga besonders für das Muskelgewebe zu erklären.

Hinweise darauf, dass nicht nur die NRTIs sondern auch die Protease Inhibitoren (PI) die Laktatproduktion *in vitro* erhöhen und frühe biochemische Veränderungen in der mitochondrialen Funktion, wie Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verursachen, ergab die Studie von Nerurkar PV. Et al., 2003. Dieser Aspekt soll aber in der vorliegenden Dissertation nicht weiter diskutiert werden.

### **4. 3 Mitochondrial ausgelöste Apoptose und Seneszenz**

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Energieversorgung der Zelle. Überraschenderweise spielen sie aber auch bei der Apoptose eine wesentliche Rolle. Apoptose ist ein physiologischer Mechanismus von vielzelligen Organismen, um nicht mehr benötigte oder potenziell gefährliche Zellen aus einem Organismus zu entfernen. Zelluläre Apoptose findet mit Hilfe eines intrazellulären Signalübertragungsprogrammes statt, das eine Vielzahl von Signalmolekülen wie Caspasen, Sphingomyelinasen, Bcl-2-ähnlichen Proteinen sowie DNA-spaltenden Proteinen umfasst und zu einem guten Teil durch Mitochondrien vermittelt wird. Mitochondrien enthalten mehrere pro-apoptotische Moleküle, die ihrerseits cytosolische Proteine aktivieren welche zur Apoptose führen. Außerdem blockieren sie anti-apoptotische Proteine im Zytosol. Die Apoptose kann durch die Freisetzung dieser mitochondrialen proapoptotischen Proteine in das Cytosol initiiert werden. Dieser Vorgang scheint von Bcl-2-ähnlichen Proteinen und mehrere Ionenkanälen geregelt zu werden, insbesondere von der Permeabilität -Übergangs Pore (PTP), die von nahezu allen pro-apoptotischen Stimuli aktiviert wird. (Gulbins E et al., 2003).

Wie vorher ausgeführt, ist ein Teil der mitochondrialen Toxizität, welche mit NRTI-Therapie assoziiert ist, auch auf die HIV-Infektion selbst zurückzuführen. Frühe Studien fanden HIV RNA in Mitochondrien von infizierten Zellen und mitochondriale Alterationen sowohl in Patienten mit akutem HIV Syndrom, als auch bei stabiler Infektion. Im Rahmen der akuten HIV-Infektion kommt es zu mitochondrialen Alterationen und ausgeprägter apoptotischer Tendenz der peripheren Blutlymphozyten. So wurde das Membranpotential der Mitochondrien bei Patienten unter akuter HIV-Infektion gemessen und es konnte erwiesen werden, dass bestimmte Antioxidantien wie N-Acetyl-Cystein (NAC), Nicotinamid (NAM) oder L-Acetyl-Carnitin (LAC), eine Art protektiven Effekt zeigen (Cossarriza A. et al., 1997).

Speziell das HIV TAT Protein soll die mitochondrial induzierte Apoptose verstärken (Macho A. et al., 1999), was zur direkten Pathogenität des HIV beitragen könnte. Eine spezifische Interaktion zwischen dem HIV Protein R und dem mitochondrialen Permeabilitäts Transitions Poren Complex (PTPC) konnte durch Jactot und Kollegen (Jactot E. et al., 2001) nachgewiesen werden. Die Beteiligung des PTPC an der Zellapoptose ist ein weiterer Mechanismus, der zeigt wie das HIV spezifisch das Immunsystem zerstören könnte.

Das mitochondriale Membranpotenzial ist nach Ansicht von Sternfeld et al., 2007 der beste Marker des Mitochondrienfunktionsfähigkeit. Gemessen wurde das mitochondriale Membranpotenzial von PBMC bei HIV-negativen gesunden Individuen, bei HIV-infizierten noch nicht therapierten und bei HIV Patienten unter ART. Es war signifikant erniedrigt bei HIV-Patienten verglichen zur HIV-negativen Kontrollgruppe und mit der CD4+T Zellzahl in untherapierten Patienten und in behandelten Patienten signifikant korreliert. Die Werte erholten sich bei therapienaiven Patienten nach Therapiebeginn. Patienten mit LA hatten deutlich niedrigere Werte als solche ohne LA bzw. LD. Später wiesen die Autoren den Zusammenhang von erniedrigtem mt Membranpotential in PBMC, gemessen mit einem zytometrischen Farbttest, mit der Anzahl apoptotischer Zellen nach (Sternfeld et al., 2009 ). Nicht therapierte Patienten hatten niedrigere Werte als solche mit einer Therapie, wobei die verwendeten Mittel nicht näher spezifiziert wurden.

Ciccosanti F. et al., 2010 führten eine Proteom-Analyse der PBMCs von HIV-Patienten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie durch. Die Patienten waren entweder noch nicht therapiert oder unter HAART mit AZT oder D4T. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigten die HIV-Patienten unter HAART erniedrigte Spiegel mitochondrialer Enzyme und Chaperone sowie Alterationen des mitochondrialen Zytoskeletts. Bemerkenswert ist, dass die meisten dieser Veränderungen bereits bei untherapierten HIV-Trägern erkennbar waren, und nach HAART-Gabe persistierten oder zunahmen, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Alterationen durch die HIV-Infektion selbst initiiert werden. *In vitro* Experimente zeigten, dass die Down-Regulation des mitochondrialen Chaperons Prohibitin ein ursächlicher Schritt in der Ausbildung des NRTI-induzierten mitochondrialen Schadens ist.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass HIV-Patienten unter ART frühzeitig altern, was zu einem progressiven Multiorganversagen unklarer Ursache führt. Payne BA. et al., 2011 zeigten, dass Patienten, welche mit den üblichen NRTIs behandelt werden, somatische mitochondriale DNA-Mutationen akkumulieren, ähnlich denen beim normalen Alterungsprozess. Ultratiefe Resequenzierung kombiniert mit Einzelzellanalysen deutet darauf hin, dass die Zunahme an somatischen Mutationen nicht durch erhöhte Mutagenese verursacht wird, sondern durch erhöhten mtDNA Turnover. Dies führt zu klonaler Expansion von präexistenten somatischen mtDNA

Mutationen und einem biochemischen Defekt, der bis zu 10% der Zellen betreffen kann. Diese Beobachtungen zeigen die Rolle der somatischen mtDNA Mutationen im Alterungsprozess und erhöhen das Spektrum der zu erwartenden progressiven iatrogenen mitochondrialen genetischen Erkrankungen für die nächsten Jahrzehnte. Die Ergebnisse können auch die Befunde vieler Studien erklären, warum die mt Funktionen durch NRTIs herabgesetzt sein können, obwohl die mtDNA Menge nicht verringert oder sogar erhöht ist.

Die ANRS-EP 45 Alterungsstudie von Perrin S. et al., 2012 untersucht ebenfalls die mitochondrialen Mechanismen, welche an der vorzeitigen Alterung HIV-infizierter und therapierter Patienten beteiligt sind. Es wurden unbehandelte HIV-Patienten, behandelte Patienten und eine gesunde Kontrollgruppe untersucht. Bei mehr als 88% der behandelten Patienten waren die Viruslast <40 Kopien/ml und die CD4+ Zellzahl >500/mm<sup>3</sup>. ROS (reactive oxygen species) Produktion und mitochondriales Membranpotential wurden via Flow-Cytometry in Blutlymphozyten und Monozyten gemessen. Drei mitochondriale PBMC Proteine (Porin und Untereinheit 2 und 4 der Cytochrome C Oxidase, kodiert sowohl durch mtDNA als auch durch nucleäre DNA) wurden mittels Western Blotting analysiert. Bei Patienten, die als klinisch stabil galten, zeigten die Mitochondrien funktionelle und morphologische Modifikationen in PBMCs, welche Folgen des direkten oder indirekten Effekts der HIV-1 Infektion (Lymphozyten) oder der ART (Monozyten) sind. Zusammen mit anderen Gewebsschädigungen führen diese Veränderungen zu globaler Alterung.

#### ***4.4 ART als perinatale Expositionsprophylaxe***

Ein wichtiger Aspekt der HIV-Therapie ist ihre Auswirkung auf Kinder positiver Mütter vor der Geburt. Eine solche Therapie kann meistens die Übertragung auf das Kind verhindern, jedoch stellt sich die Frage nach der langfristigen Verträglichkeit für das Kind, nicht zuletzt wegen der mitochondrialen Toxizität.

Barret et al., 2003 untersuchten prospektiv 4392 nicht infizierte Kinder HIV-seropositiver Mütter, wobei 2644 einer perinatalen Expositionsprophylaxe mit ART ausgesetzt worden waren. Bei 12 Kindern mit neurologischen Symptomen wurden mehrere Merkmale mitochondrialer Dysfunktion wie Hyperlaktatämie, beeinträchtigte Atmungskette oder typische Histologie gefunden. Bei 14 weiteren Kindern, die ART

ausgesetzt waren, wurden neurologische Symptome gefunden, die mit mitochondrialer Dysfunktion vereinbar sind. Fazit dieser Arbeit ist, dass diese Kinder mit einer 18 Monats-Inzidenz von 0,26 % ein mindestens 25 fach erhöhtes Risiko haben, neurologische Syndrome zu entwickeln, die mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert sind.

Cotè et al., 2008 verglichen prospektiv mtDNA Blut-Werte und mtDNA Genexpression (mtRNA) bei HIV nicht infizierten, ART-behandelten Säuglingen HIV-positiver Mütter mit Kontrollsäuglingen uninfizierter Mütter. Das mtGen CCOI und das nukleäre Gen ASPG (Asparaginase) wurden per qPCR quantifiziert. Der mtDNA Gehalt kurz nach der Geburt war bei ART-behandelten Säuglingen *höher* als bei den Unbehandelten, jedoch verfehlten die Unterschiede knapp die statistische Signifikanz. Der mtDNA Gehalt erhöhte sich bei den ART-behandelten Säuglingen während der AZT Prophylaxe im Alter von 4 Tagen bis 6 Wochen weiter und blieb bis zum Ende der Studie nach 8 Monaten signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war der mtRNA Gehalt bei ART-behandelten Kindern bei Geburt signifikant niedriger, später aber nicht mehr. Im Vergleich zeigte sich also ein erhöhter mtDNA Gehalt, aber eine reduzierte mt Genexpression bei ART-behandelten Säuglingen. Diese Unterschiede bestanden nach Absetzen des Zidovudin weiter, so dass man davon ausgehen kann, dass Änderungen in der mitochondrialen Proliferation und/oder Expression während und nach ART Exposition längerfristig wirken.

Für das Wohl des ungeborenen Kindes ist auch die Funktionsfähigkeit der Plazenta entscheidend. Die Arbeit von Gingelmaier et al., 2009 hatte zum Ziel, den Effekt von HIV-1 Infektion und ART auf Mitochondrien in der Plazenta zu bestimmen. Man untersuchte prospektiv HIV-1 infizierte Schwangere und eine gesunde Kontrollgruppe. Per qPCR wurde das mtDNA/nDNA Verhältnis bestimmt und die absolute Kopienanzahl wurde mit Hilfe serieller Plasmidverdünnungen bekannter Konzentrationen ausgerechnet. Außerdem wurden die Untereinheiten II und IV der COX per Western Blot quantifiziert und die mitochondriale Ultrastruktur elektronenmikroskopisch untersucht. Der venöse Blutlaktatspiegel wurde bei den Neugeborenen gemessen. Das Plazentagewebe von HIV-1 infizierten Schwangeren unter ART wies erhebliche Depletionen der mtDNA um den Faktor 3 und daraus resultierend Beeinträchtigungen der Atmungskette auf. Der Blutlaktatspiegel der

Neugeborenen war negativ mit dem mtDNA-Gehalt der Plazenta korreliert, auch wenn es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab.

Brogly et al., 2011 evaluierten die Mitochondrien in PBMC von Kindern mit und ohne klinische Zeichen mitochondrialer Dysfunktion (MD) und ART-Exposition. Mt-DNA Menge und Aktivität der NADH Dehydrogenase (Komplex I) sowie Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) wurden bestimmt. In Proben, welche 18 Monate nach der Geburt entnommen wurden, waren die mtDNA Mengen *höher*, aber die Atmungskettenenzyme zum Teil niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Deletionen konnten nicht nachgewiesen werden. Der mt Haplotyp H war seltener bei den Betroffenen als in der Kontrollgruppe und könnte somit eventuell einen Schutzfaktor gegen die mitochondriale Toxizität der NRTI darstellen. Die Langzeit-Signifikanz dieser geringen, jedoch potentiell wichtigen Alterationen sollten nach Auffassung der Autoren weiter untersucht werden, wenn diese Kinder heranwachsen. Im Vergleich zur Studie mit den relevanten Primatengeweben (Divi et al., 2010) sind die Effekte in den PBMC aber eher als marginal zu bezeichnen.

Eine ähnliche Studie führten auch Morén et al., 2012 durch. In dieser Querschnittsstudie wurden 47 asymptomatische HIV-infizierte, mit HAART behandelte Kinder und Erwachsene, sowie eine gesunde pädiatrische Kontrollgruppe untersucht. Es wurde der mtDNA und mtRNA Gehalt per qPCR in PBMC bestimmt. Die mitochondriale Atmungskettenenzymaktivität und die mitochondriale Proteinmenge wurden spektrophotometrisch gemessen und die Komplex IV Protein Untereinheit wurde per Westernblotanalyse bestimmt. Eine Verringerung der mtDNA Menge konnte bei den HIV-infizierten Kindern gezeigt werden, die anderen gemessenen Parameter zeigten in beiden Gruppen ähnliche Werte. Der mtDNA Gehalt bei den betroffenen Kindern korrelierte nicht mit Viruslast, CD4+Zellzahl oder Laktatämie zum Abnahmezeitpunkt. Die mtDNA Depletion bei den asymptomatisch mit HIV infizierten Kindern führte nicht zu erniedrigten Mengen an mtRNA oder mitochondrial kodierten Komplex IV Proteinen bzw. deren Dysfunktion. Dies könnte durch homeostatisch-kompensatorische Mechanismen auf der Transkriptionsebene oder durch die relativ geringe mtDNA Depletion erklärt werden.

In Utero stattgefundene ART-Exposition und mitochondriale Toxizität in einer Kohorte gesunder Säuglinge HIV-1-infizierter Mütter wurde auch von Fernandez Ibieta et al., 2010 untersucht. Die Laktatspiegel und andere mitochondriale Schädigungsmarker

wie erhöhte Transaminasen oder Amylasen im Serum wurden in den ersten 3 Lebensmonaten untersucht. Ein hoher Anteil der Säuglinge zeigte Hyperlaktatämie, ohne jedoch eine erhöhte Morbidität oder Mortalität zu zeigen.

Die Arbeit von Ross et al., 2012 beschäftigte sich ebenfalls mit dem Effekt von HIV und ART nach *in utero* Exposition. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kinder eine erniedrigte mitochondriale Expression im Nabelschnurblut hatten mit erhöhten mtDNA Mengen im peripheren Blut. Letzteres stellt vermutlich einen kompensatorischen Mechanismus dar, um die HIV/ART-assoziierte mitochondriale Toxizität zu überwinden.

In der Studie von Morèn C. et al., 2012 geht es darum, die zeitliche Entwicklung der mitochondrialen Parameter bei Kindern unter verschiedenen ART Regimen zu untersuchen. Das Hauptziel in der Behandlung HIV-infizierter Kinder ist die Effektivität zu maximieren und die Toxizität zu minimieren. Es wurden HIV-infizierte Kinder unter HAART entweder mit 1.Generation 1gNRTI (Didanosine, Zidovundine oder D4T) oder mit NRTIs der 2.Generation (2gNRTI) für die Zeitdauer eines Jahres beobachtet. Der infektiologische und mitochondriale Status im Vergleich zu einer unbehandelten HIV-infizierten Patientengruppe und einer gesunden Kontrollgruppe wurde verfolgt. T-Lymphozyten CD4+, Viruslast, Laktatspiegel, mtDNA Gehalt, mitochondrialer Proteingehalt, oxidativer Stress, mitochondriale Masse und die Atmungskette wurden in PBMCs gemessen. Es ergab sich, dass HIV-Infektion und 1gNRTIs mit der Zeit einen größeren mitochondrialen Schaden verursachen als 2gNRTIs. Die höheren Laktatlevel und der signifikante Abfall der Cytochrome c Oxidase Aktivität sind Argumente gegen den weiteren Gebrauch der 1gNRTIs bei HIV-infizierten Kindern.

Angesichts der unklaren und widersprüchlichen Ergebnisse klinischer Beobachtungen kann ein möglichst authentischer Tierversuch eventuell weiterführen. Divi et al., 2007 untersuchten die Wirkung von NRTIs auf die afrikanische Primatenart *Erythrocebus Pata* (Husarenaffen aus der Gattung der Meerkatzenartigen, Quelle Wikipedia) *in utero* im Vergleich zu Neugeborenen von HIV-infizierten Müttern. Hierzu wurde u. a. die mitochondriale Morphologie mittels Elektronenmikroskopie parallel zur mtDNA-Menge in der Nabelschnur evaluiert. Die Studie zeigte, dass menschliche und Affen-Neugeborene eine ähnliche NRTI induzierte mitochondriale Toxizität zeigen, nachdem sie über die Plazenta den

Substanzen ausgesetzt wurden. Die Mitochondrien des Nabelschnurothels von NRTI exponierten Affen- und Menschen-Neugeborenen zeigten erhebliche pathologische Veränderungen im EM und bei den Affen auch eine erniedrigte mtDNA-Menge. Die Stärke der Mitochondrienschädigung wurde in folgender Rangordnung nachgewiesen: d4T/3TC > AZT/ddI > AZT/3TC > 3TC.

Divi et al., 2010 setzten die Studie an den Husarenaffen fort. Retrovirus-freie Muttertiere wurden für die Hälfte der Trächtigkeit mit humanäquivalenten Dosen von AZT, 3TC, AZT/3TC, AZT/Didanosine (ddI), und D4T (d4T)/3TC behandelt. Danach wurden die Gehirne und Lebern der Jungen bei Geburt oder nach einem Jahr auf Schädigung der Mitochondrien untersucht. Die untersuchten Hirn- und Lebermitochondrien der Husarenaffen zeigten 1 Jahr nach Behandlung mit allen NRTI signifikante morphologische Schäden im EM und der mtDNA Gehalt war deutlich reduziert. Diese Untersuchungen legen nahe, dass manche menschliche Säuglinge, die mit NRTI exponiert waren, ähnliche mitochondriale Leber- und Hirnschäden erleiden könnten und daher kognitiv und auf die Leberfunktion nachuntersucht werden sollten. Sie erhärten auch den vermuteten Zusammenhang zwischen NRTI Prophylaxe bei der Mutter und späteren kindlichen Neuropathien, der schon von Barret et al., 2003 berichtet wurde.

Auch an Mäusen konnte der negative Effekt der NRTI Prophylaxe gezeigt werden. Die 2004 durchgeführte Studie von Bishop JB. et al. bezog sich auf die mitochondriale Schädigung am Herzen als Folge der ART Exposition *in utero* und postnatal, gemessen durch Morphometrie und semiquantitative Analyse von Mäusekardiomyozten. Die Ergebnisse demonstrieren Alterationen in den mitochondrialen Mäusekardiomyozten und können ein Modell für den bei Kindern beobachteten kardialen Schaden darstellen.

Die Arbeit von Desai VG. et al., 2009 zeigt den Effekt von kurzzeitiger AZT (ART) Exposition auf mitochondriale Gene in der Skelettmuskulatur neonataler Mäuse. AZT ist von besonderem Interesse, da es als Haupt ART während der Schwangerschaft HIV-1 infizierter Frauen zur Vermeidung einer Mutter-Kind Übertragung verabreicht wird. Ausreichende Muskelfunktion ist im besonderen Maße abhängig von effizienter mitochondrialer Funktion. Es wurde der Effekt von AZT auf die Expression 542 mitochondrialer Gene in der Skelettmuskulatur von männlichen und weiblichen Mäusejungen untersucht. Die Gene waren sowohl nukleär als auch mitochondrial

kodiert und wurden mit microarray Technologie untersucht. Die Tiere erhielten oral bestimmte AZT Dosierungen postnatal und wurden dann untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen moderaten aber signifikanten, dosisabhängigen Einfluss auf die Genexpressionsmuster, welche mit Apoptose, Fettsäurestoffwechsel, mitochondrialem DNA-Erhalt und zahlreichen mitochondrialen Membrantransportern assoziiert ist. Es konnte somit ein signifikanter mitochondrialer Morphologie-Schaden in der Skelettmuskulatur gezeigt werden. Die Resultate deuten daraufhin, dass bereits eine kurzzeitige AZT Exposition, zumindest bei Mäusejungen, Änderungen in der Expression mitochondrien-assoziiierter Gene in der Skelettmuskulatur bewirken kann.

#### ***4.5 Potentielle Vermeidung der mitochondrialen Toxizität***

Makrophagen sind für HIV-1 ein Reservoir im ZNS. Um HIV-infizierte Makrophagen im Gehirn gezielt mit NRTIs behandeln zu können, entwickelten Vinogradov SV et al., 2010 Nanoträger für aktivierte NRTIs, nano-NRTIs genannt. Intrazelluläre Akkumulation, Zytotoxizität und antivirale Aktivität der nano-NRTIs wurden in Monocyte-derived Macrophages (MDMs) verfolgt. Die HIV-Aktivität wurde nach nano-NRTI Gabe über die Reverse-Transkriptase Aktivität gemessen. Mt-DNA Depletion in MDMs und in humanen HepG2 –Zellen wurde durch quantitative PCR-Messung ermittelt. Die mitochondriale Toxizität, eine Hauptursache der NRTI Neurotoxizität, konnte mit Hilfe dieser selektiven Nano-NRTI Gabe dreifach reduziert werden. Somit zeigen Nano-NRTIs eine vielversprechende antivirale Wirkung gegen HIV in MDMs und zeigen großes Potential als Nanoträger für den Transport der ART zu Makrophagen im Gehirn.

Walker et al., 2005 konnten eine Uridingabe als mögliche Präventiv- wie auch Therapiemaßnahme der mitochondrialen Toxizität in Aussicht stellen. Die Studie zeigte, dass Uridin in Hepatozyten sowohl eine präventive als auch therapeutische Wirkung auf die mtDNA Depletion hatte. Sehr positive Effekte sowohl auf den Lipidhaushalt, als auch auf die Hämatopoese konnten nachgewiesen werden.

Die Rolle der Pyrimidinepletion in der mitochondrialen Kardiotoxizität von NRTIs wurde von Balcarek K. et al., 2010 im Tierexperiment ermittelt. Mäuse wurden mit AZT oder Zalcitabine mit oder ohne zusätzliche Gabe von Mitocnol, einem diätischen

Nahrungsergänzungsmittel mit hoher Uridin Bioverfügbarkeit, gefüttert. Ihr Myokard wurde nach 9 Wochen untersucht. Beide NRTIs induzierten Kardiomyopathien mit mitochondrialer Vergrößerung und zerstörter Architektur im EM. Die Gabe von Mitocnol schwächte diesen Effekt ab und normalisierte alle myokardialen Pathologien bei zusätzlicher Verabreichung. Da Uridin gut toleriert wurde, könnte es klinisch zur Wiederauffüllung der Pyrimidin-Pools verwendet werden.

Im Rahmen der zunehmenden Prävalenz der HIV-1 assoziierten neurokognitiven Störungen untersuchten Manda et al., 2011, ob HAART Kombinationen von AZT und IDV die Funktionalität der Bluthirnschranke (BBB) alterieren können. Die Lebensfähigkeit von hCMEC/D3 Zellen (einem *in vitro* Modell der BBB), welche diesen Medikamenten ausgesetzt wurden, waren nach 72h der Therapie signifikant reduziert. Reaktive Sauerstoffspezies waren nach Exposition stark erhöht und zeigten somit, dass oxidativer Stress stattgefunden hat. Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, gemessen per Fluoreszenzmikroskopie und erniedrigte ATP-Spiegel zeigten, dass die Zytotoxizität durch MD. verursacht wurde. AZT+IDV Behandlung verursachte Apoptose in endothelialen Zellen. Vorbehandlung mit demThiol-Antioxidans N-Acetylcysteinamid konnte die pro-oxidativen Effekte teilweise umkehren.

## 5. Literaturverzeichnis

- **Allen TM, O'Connor DH, Jing P.** Tat- specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 2000;407:386-390.
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- **Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA.** Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients withAZT-induced myopathy. *Lancet* 1991, 337:508-510.
- **.Balcarek K, Venhoff N, Deveaud C, Beauvoit B, Bonnet J, Kirschner J, Venhoff AC, Lebrecht D, Walker UA.** Role of pyrimidine depletion in the

- mitochondrial cardiotoxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Dec 15;55(5):550-7.
- **Banas B, Kost BP, Goebel FD.** Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells. *Eur J Med Res*. 2004 Aug 31;9(8):371-7.
  - **Banasch M, Knyhala K, Kollar S, Serova K, Potthoff A, Schlottmann R, Schmidt WE, Brockmeyer NH, Goetze O.** Disease- and treatment-related predictors of hepatic mitochondrial dysfunction in chronic HIV infection assessed by non-invasive (13)C-methionine breath test diagnostic. *Eur J Med Res*. 2008 Sep 22;13(9):401-8.
  - **Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* (1983) 220, p. 868-871.
  - **Barret B, Tardieu M, Rustin P, Lacroix C, Chabrol B, Desguerre I, Dollfus C, Mayaux MJ, Blanche S; French Perinatal Cohort Study Group.** Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort. *Source INSERM U569 (Epidémiologie, Démographie et Sciences Sociales) Hôpital Bicêtre AP-HP, Le Kremlin Bicêtre, France. AIDS*. 2003 Aug 15;17(12):1769-85.
  - **Bartlett JG, Gallant JE.** 2001-2002 Medical Management of HIV Infection. Published by John Hopkins University, Division of Infectious Diseases .2001.
  - <http://www.hawaii.edu/hivandaids/ClinicalMngtoftheHIVInfectedAdultAManualForMidlevelClinicians.pdf>
  - **Bätzing-Feigenbaum J, Loschen S, Gohlke-Micknis S, Hintsche B, Rausch M, Hillenbrand H, Cordes C, Poggensee G, Kücherer C, Hamouda O:** Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007. *HIV Med*. 2009 Apr;10(4):209-18.
  - **Bishop JB, Tani Y, Witt K, Johnson JA, Peddada S, Dunnick J, Nyska A.** Mitochondrial damage revealed by morphometric and semiquantitative analysis of mouse pup cardiomyocytes following in utero and postnatal exposure to AZT and 3TC. *Toxicol Sci*. 2004 Oct;81(2):512-7.

- **Brogly SB, DiMauro S, Van Dyke RB, Williams PL, Naini A, Libutti DE, Choi J, Chung M, Gerschenson M.** Short communication: transplacental nucleoside analogue exposure and mitochondrial parameters in HIV-uninfected children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Jul;27(7):777-83.
- **Calzavara L, Burchell AN, Major C.** Increases in HIV incidence among men who have sex with men undergoing repeat diagnostic HIV testing in Ontario, Canada. *AIDS* 2002, 16: 1655-61.
- **Carr A, Miller J, Law M, Cooper DA.** A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to PI-related lipodystrophy syndrome. *AIDS* 2000, 14:F25-F32
- **Carr A, Samaras K, Burton S,** A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV PIs. *AIDS* 1998, 12:F51-F58.
- **Centers for Disease Control.** A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982; 31: 305
- **Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89(2):263-73
- **Chiappini F, Teicher E, Saffroy R, Pham P, Falissard B, Barrier A, Chevalier S, Debuire B, Vittecoq D, Lemoine A.** Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Lab Invest*. 2004 Jul;84(7):908-14.
- **Ciccosanti F, Corazzari M, Soldani F, Matarrese P, Pagliarini V, Iadevaia V, Tinari A, Zaccarelli M, Perfettini JL, Malorni W, Kroemer G, Antinori A, Fimia GM, Piacentini M.** Proteomic analysis identifies prohibitin down-regulation as a crucial event in the mitochondrial damage observed in HIV-infected patients. *Antivir Ther*. 2010;15(3):377-90.
- **Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey Ma, Santos-Ferreira O.** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 198;233:343.
- **Cossarizza A, Mussini C, Mongiardo N, Borghi V, Sabbatini A, De Rienzo**

- B, Franceschi C.** Mitochondria alterations and dramatic tendency to undergo apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome. Department of Biomedical Sciences, University of Modena School of Medicine, Italy. *AIDS*. 1997 Jan11(1):19-26.
- **Cossarizza A, Riva A, Pinti M, Ammannato S, Fedeli P, Mussini C, Esposito R, Galli M.** Increased mitochondrial DNA content in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients with lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003 Aug;8(4):315-21
  - **Côté HC, Raboud J, Bitnun A, Alimenti A, Money DM, Maan E, Costei A, Gadawski I, Diong C, Read S, Shen S, Harrigan PR, Burdge DR, King SM, Forbes JC.** Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *J Infect Dis*. 2008 Sep 15;198(6):851-9.
  - **Cruickshank WW, Oh SY, Raina J,** Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J Acquired Immune Deficiency Syndrome* 1992;5:251
  - **DeJesus E, Herrera G, Teofilo E, Gerstoff J, Buendia CB, Brand JD,** et al. Abacavir versus AZT combined with 3TC and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naïve HIV-infected adults. *Clin Infect Dis* 2004 Oct 1; 39(7):1038-46.
  - **Desai VG, Lee T, Moland CL, Branham WS, Von Tungeln LS, Beland FA, Fuscoe JC.** Effect of short-term exposure to AZT (AZT) on the expression of mitochondria-related genes in skeletal muscle of neonatal mice. *Mitochondrion*. 2009 Feb;9(1):9-16.
  - **Deutsch-Österreichische Leitlinien** zur Therapie der HIV-1-Infektion, konsentiert Version vom 28.05.2010. [http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1/Leitlinien\\_28-05-2010\\_V\\_late.pdf](http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1/Leitlinien_28-05-2010_V_late.pdf)
  - **Divi RL, Leonard SL, Kuo MM, Nagashima K, Thamire C, St Claire MC, Wade NA, Walker VE, Poirier MC.** Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Environ Mol Mutagen*. 2007 Apr-May;48(3-4):201-9.
  - **Divi RL, Einem TL, Fletcher SL, Shockley ME, Kuo MM, St Claire MC, Cook A, Nagashima K, Harbaugh SW, Harbaugh JW, Poirier MC.**

- Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Toxicol Sci.* 2010 Nov;118(1):191-201.
- **Einsiedel L, Cherry CL, Sheeran FL, Friedhuber A, Wesselingh SL, Pepe S.** Mitochondrial dysfunction in CD4+ lymphocytes from d4T-treated HIV patients. *Mitochondrion.* 2010 Aug;10(5):534-9.
  - **Eron J Jr, Yeni P, Gathe J Jr, Estrada V, DeJesus E, Staszewski S, Lackey P, Katlama C, Young B, Yau L, Sutherland-Phillips D, Wannamaker P, Vavro C, Patel L, Yeo J, Shaefer M; KLEAN study team.** The KLEAN study of fosamprenavir-ritonavir versus lopinavir-ritonavir, each in combination with abacavir- 3TC, for initial treatment of HIV infection over 48 weeks: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2006 Aug 5;368(9534):476-82.
  - **Fernández Guerrero ML, Rivas P, Molina M, Garcia R, De Górgolas M.** Long-term follow-up of asymptomatic HIV-infected patients who discontinued antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2005 Aug 1;41(3):390-4.
  - **Fernández Ibieta M, Cano JM, Amador JT, González-Tomé MI, Martín SG, Gómez MN, de José MI, Beceiro J, Iglesias E, Prieto L, Santos MJ, Guardia NM, Roa MA, Regidor J.** [In-utero antiretroviral exposure and mitochondrial toxicity in a cohort of uninfected infants born to HIV-1-infected women]. [Article in Spanish] *An Pediatr (Barc).* 2010 Oct;73(4):180-8.
  - **Ferraresi R, Troiano L, Rossi D, Gualdi E, Lugli E, Mussini C, Cossarizza A.** Mitochondrial membrane potential and nucleosidic inhibitors of HIV reverse transcriptase: a cytometric approach. *Mitochondrion*,2004 Jul;4(2-3):271-278.
  - **Fidler S, Fox J, Porter K, Weber J.** Primary HIV infection: to treat or not to treat? *J. Infect Dis.* 2008 Feb;21(1):4-10.
  - **Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP:** Isolation of human T cell leukaemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:865-867
  - **Garrabou G, Morén C, Gallego-Escuredo JM, Milinkovic A, Villarroya F, Negrodo E, Giralt M, Vidal F, Pedrol E, Martínez E, Cardellach F, Gatell JM, Miró O.** Genetic and functional mitochondrial assessment of HIV-infected patients developing HAART-related hyperlactatemia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Dec 1;52(4):443-51.
  - **Gathe JC Jr, Ive P, Wood R, Schürmann D, Bellos NC, DeJesus E, Gladysz A, Garris C, Yeo J.** 48-week efficacy and safety comparison of once-

- daily fosamprenavir /ritonavir versus twice-daily nelfinavir in naive HIV-1-infected patients. *AIDS* 2004 Jul 23;18(11):1529-37.
- **Gerschenson M, Kim C, Berzins B, Taiwo B, Libutti DE, Choi J, Chen D, Weinstein J, Shore J, da Silva B, Belsey E, McComsey GA, Murphy RL.** Mitochondrial function, morphology and metabolic parameters improve after switching from d4T to a tenofovir-containing regimen. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1244-50 Epub 2009 Mar 25.
  - **Gingelmaier A, Grubert TA, Kost BP, Setzer B, Lebrecht D, Mylonas I, Mueller-Hoecker J, Jeschke U, Hiedl S, Friese K, Walker UA.** Mitochondrial toxicity in HIV type-1-exposed pregnancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2009;14(3):331-8.
  - **Gourlain K, Amellal B, Ait Arkoub Z, Dupin N, Katlama C, Calvez V.** Quantitative analysis of human mitochondrial DNA using a real-time PCR assay. *HIV Med.* 2003 Jul;4(3):287-92
  - **Graff J, von Hentig N, Kuczka K.** Significant effects of tipranavir on platelet aggregation and thromboxane B2 formation in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:394-9.
  - **Gray, M.W.** (2001): The origin and early evolution of mitochondria. In: *Genome Biology*. Bd. 2, Nr. 6, reviews1018.1-1018.5
  - **Gulbins E , Dreschers S , Bock J .** Rolle der Mitochondrien in der Apoptose. *Exp Physiol* 2003 Jan; 88 (1) :85-90.
  - **Gulick RM, Ribaud HJ, Shikuma CM, Lustgarten S, Squires KE, Meyer WA 3rd, Acosta EP, Schackman BR, Pilcher CD, Murphy RL, Maher WE, Witt MD, Reichman RC, Snyder S, Klingman KL, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group Study A5095 Team.** Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2004 Apr 29;350(18):1850-61.
  - **Gulick RM, Ribaud HJ, Shikuma CM, Lalama C, Schackman BR, Meyer WA 3rd, Acosta EP, Schouten J, Squires KE, Pilcher CD, Murphy RL, Koletar SL, Carlson M, Reichman RC, Bastow B, Klingman KL, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Study Team.** Three- vs four-drug antiretroviral regimens for the initial treatment of HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006 Aug 16;296(7):769-81.
  - **Yang C, Dash BC, Simon F, van der Groen G, Pieniazek D, Gao F, Hahn**

- BH, Lal RB.** Detection of diverse variants of human immunodeficiency virus-1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses from chimpanzees by using generic pol and env primer pairs. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1791-5.
- **Hamouda O:** Aktuelle Daten zur Epidemiologie von HIV und AIDS. *MMW Fortschr Med* 2010; 152:27–31.
  - **Harrington M, Carpenter CC.** Hit HIV-1 hard, but only when necessary. *Lancet* 2000, 355:2147-52.
  - **Highleyman L.** Adverse effects associated with antiretroviral therapy. BETA, Spring, 2000. <http://hiv-net/link.php?id=18>
  - **HIV.net.** <http://hivbuch.de/category/teil-2-antiretrovirale-therapie-art/6-2-substanzklassen-medikamentenubersicht/>
  - **Hofstede HJ, Borm GF, Koopmans PP.** Oral glucose loading for detection of mitochondrial toxicity during HAART in HIV-infected patients. *Curr HIV Res.* 2007 Jul;5(4):389-93.
- Robert Koch-Institut.** Infektionsepidemiologische Daten von Blutspendern 2006. Bericht des Robert Koch-Instituts zu den Meldungen nach § 22 Transfusionsgesetz. Bundesgesundheitsbl–Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 2008; 51:902–914.
- **Jablonski H.** Antiretroviral therapy 2003. The current status. *MMW Fortschr Med*; 2004 Apr 26;146 Spec No 1:46-8, 50-1
  - **Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Métivier D, Lenoir C, Geuskens M, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G.** Control of mitochondrial membrane permeabilisation by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J Exp Med* 2001;193:509–19.
  - **Jakobs S.** Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle, *MBIbpc News*, Ausgabe Nr.12 , Dezember 2004
  - **Jonas T,** Größe und Populationsverteilung des Hepatitis C Virus, Dissertation Fachbereich Medizin der Justus Liebig Universität Gießen 2005, <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2044/pdf/JonasTilo-2005-02-15.pdf>

- **Korber B.,M. Muldoon,J. Theiler.** Timing the origin of the HIV-1 pandemic. In: Programs and abstracts of the 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract L5, 30. January 30-2. February 2000
- **Kopp JB.** Renal Dysfunction in HIV-1 infected patients. *Cur Infect Dis Rep* 2002; 4:449-460.
- **Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS, Zhao J, Xu X, Williams-Diaz A, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, DiNubile MJ, Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P; STARTMRK investigators.** Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2009 Sep 5;374(9692):796-806.
- **Lill, R. Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Mühlenhoff U, Winge DR.** The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biological Chemistry* 1999; **380**:1157-1166.
- **Löffler M, Jöckel J, Schuster G, Becker C.** Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:125-129.
- **López S, Miró O, Martínez E, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Milinkovic A, Soler A, García-Viejo MA, Nunes V, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F.** Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients. *Antivir Ther.* 2004 Feb;9(1):47-55
- **Thompson MA, JA Aberg, P Cahn, and others.** Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2010 Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 304(3): 321-333
- **Maagaard A, Holberg-Petersen M, Kollberg G, Oldfors A, Sandvik L, Bruun JN** Mitochondrial (mt)DNA changes in tissue may not be reflected by depletion of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. *Antivir Ther.* 2006;11(5):601-8.
- **Maagaard A, Kvale D.** Mitochondrial toxicity in HIV-infected patients both off and on antiretroviral treatment: a continuum or distinct underlying mechanisms? *J Antimicrob Chemother.* 2009 Nov;64(5):901-9.
- **Macho A, Calzado MA, Jiménez-Reina L, Ceballos E, León J, Muñoz E.** Susceptibility of HIV-1-TAT transfected cells to undergo apoptosis. Biochemical mechanisms. *Oncogene* 1999; 18:7543–51.

- **Mallon PWG, Miller J, Cooper DA, Carr A.** Prospective evaluation of the effects of antiretroviral therapy on body composition in HIV-1-infected men starting therapy. *AIDS* 2003; 17:971-79.
- **Manda KR, Banerjee A, Banks WA, Ercal N.** Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2011 Apr 1;50(7):801-10.
- **Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T** Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 2001 Jan 5;15(1):71-5.
- **McArthur JC, Catherine Cherry LC, Hoya JF, , Wesselingh SL.** Nucleoside analogues and neuropathy in the era of HAART. *J Clin Virol* 2003; 26:195–207. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665320200118X>
- **McComsey GA, Ward DJ, Hessenthaler SM.** Improvement in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients switched from d4T to abacavir or AZT: the results of the TARHEEL study. *Clin Infect Dis* 2004; 38:263-270
- **Milazzo L, Piazza M, Sangaletti O, Gatti N, Cappelletti A, Adorni F, Antinori S, Galli M, Moroni M, Riva A.** [13C]Methionine breath test: a novel method to detect antiretroviral drug-related mitochondrial toxicity. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jan;55(1):84-9.
- **Miró O, López S, Martínez E, Pedrol E, Milinkovic A, Deig E, Garrabou G, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F.** Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis.* 2004 Sep 1;39(5):710-6.
- **Miró O, Garrabou G, López S, Deig E, Vidal I, Infante AB, Cardellach F, Casademont J, Pedrol E.** Short communication metabolic and mitochondrial effects of switching antiretroviral-experienced patients to enfuvirtide, tenofovir and saquinavir/ritonavir. *Antivir Ther.* 2006;11(5):625-30.
- **Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A.** Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J Med Virol.* 2003 Aug;70(4):497-505.
- **Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U.** *Molekulare Virologie.* 2010

- **Montaner JS, Côté HC, Harris M, Hogg RS, Yip B, Chan JW, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV.** Mitochondrial toxicity in the era of HAART: evaluating venous lactate and peripheral blood mitochondrial DNA in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Sep;34 Suppl 1:S85-90.
- **Morén C, Noguera-Julian A, Garrabou G, Catalán M, Rovira N, Tobías E, Cardellach F, Miró Ò, Fortuny C** Mitochondrial evolution in HIV-infected children receiving first- or second-generation nucleoside analogues. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Jun 1;60(2):111-6.
- **Morén C, Noguera-Julian A, Rovira N, Garrabou G, Nicolàs M, Cardellach F, Martínez E, Sánchez E, Miró O, Fortuny C.** Mitochondrial assessment in asymptomatic HIV-infected paediatric patients on HAART. *Antivir Ther.* 2011;16(5):719-24.
- **Morse CG, Voss JG, Rakocevic G, McLaughlin M, Vinton CL, Huber C, Hu X, Yang J, Huang da W, Logun C, Danner RL, Rangel ZG, Munson PJ, Orenstein JM, Rushing EJ, Lempicki RA, Dalakas MC, Kovacs JA.** HIV infection and antiretroviral therapy have divergent effects on mitochondria in adipose tissue. *J Infect Dis.* 2012 Jun 15;205(12):1778-87.
- **Mussini C, Pinti M, Bugarini R, Borghi V, Nasi M, Nemes E, Troiano L, Guaraldi G, Bedini A, Sabin C, Esposito R, Cossarizza A.:** Effect of treatment interruption monitored by CD4 cell count on mitochondrial DNA content in HIV-infected patients: a prospective study. *AIDS.* 2005 Oct 14;19(15):1627-33
- **Nolan D, John M, Mallal S.** Antiretroviral therapy and the lipodystrophy syndrome, part 2: concepts in aetiopathogenesis. *Antivir Ther* 2001; 6:145-60.
- **Nerurkar PV, Pearson L, Frank JE, Yanagihara R, Nerurkar VR.** Highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lactic acidosis: in vitro effects of combination of nucleoside analogues and PIs on mitochondrial function and lactic acid production. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003 Dec;49(8):1205-11.
- **Olyaei AJ, de Mattos AM, Benett WM.** Renal toxicity of PIs. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000, 9:473-6.
- **Payne BA, Wilson IJ, Hateley CA, Horvath R, Santibanez-Koref M, Samuels DC, Price DA, Chinnery PF.** Mitochondrial aging is accelerated by

anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations. *Nat Genet.* 2011 Jun 26;43(8):806-10.

- **Perrin S, Cremer J, Roll P, Faucher O, Ménard A, Reynes J, Dellamonica P, Naqvi A, Micallef J, Jouve E, Tamalet C, Solas C, Pissier C, Arnoux I, Nicolino-Brunet C, Espinosa L, Lévy N, Kaspi E, Robaglia-Schlupp A, Poizot-Martin I, Cau P.** HIV-1 Infection and First Line ART Induced Differential Responses in Mitochondria from Blood Lymphocytes and Monocytes: The ANRS EP45 "Aging" Study. *PLoS One.* 2012;7(7):e41129.
- **Petit C, Mathez D, Barthélémy C, Leste-Lasserre T, Naviaux RK, Sonigo P, Leibowitch J.** Quantitation of blood lymphocyte mitochondrial DNA for the monitoring of antiretroviral drug-induced mitochondrial DNA depletion. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Aug 1;33(4):461-9.
- **Pinti M, Troiano L, Nasi M, Moretti L, Monerastelli E, Mazzacani A, Mussi C, Ventura P, Olivieri F, Franceschi C, Salvioli G & Cossarizza A.** Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. *Cell Death & Differentiation* 2002; 9:431–438.
- **Plantier, Jean-Christophe; Leoz, Marie, Dickerson Jonathan E, De Oliveira Fabienne, Cordonnier Francois, Lemée, Veronique, Damond Florence,**
- **Polo R, Martinez S, Madrigal P, Gonzalez-Muñoz M.** Factors associated with mitochondrial dysfunction in circulating peripheral blood lymphocytes from HIV-infected people. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Sep 1;34(1):32-6
- **Price DA, Goulder PJ, Klenerman P.:** Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94:1890-1895
- **Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Hirsch MS.** The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 1987 Jul 23;317(4):192-7.
- **Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, Klingman KL, Garren KW, George T, Rooney JF, Brizz B, Lalloo UG, Murphy RL, Swindells S, Havlir D, Mellors JW.** Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008 May 15;358(20):2095-106.

- **Riddler SA, Haubrich RH, DiRienzo AG, Komarow L, Powderly WG, Klingman K, Garren KW, Butcher DL, Rooney JF, Haas DW, Mellors JW, Havlir DV;** Metabolic outcomes in a randomized trial of nucleoside, nonnucleoside and protease inhibitor-sparing regimens for initial HIV treatment. *AIDS*. 2009 Jun 1;23(9):1109-18.
- **Robert-Koch-Institut.** HIV/AIDS. Aktualisierte Fassung vom März 2011. RKI-Ratgeber für Ärzte. [www.rki.de](http://www.rki.de) > Infektionsschutz > RKI- Ratgeber.
- **Robert-Koch-Institut.** Analyse der HIV-Meldedaten 2000–2007 zu Migranten aus Hochprävalenzländern im Rahmen der HIV-Inzidenzstudie am RKI. *Epid Bull* 2009; 1:1–5.
- **Robert-Koch-Institut.** HIV bei Migranten in Deutschland. *Epid Bull* 2011; 3:19–21.
- **Robert-Koch-Institut.** HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland – Jahresbericht zur Entwicklung im Jahr 2010 aus dem Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 2011; 21:179–198.
- **Robert-Koch-Institut.** Zum Welt-AIDS-Tag 2011: Schätzung der Prävalenz und Inzidenz von HIV-Infektionen in Deutschland; Zur Situation in Deutschland – Eckdaten. *Epid Bull* 2011; 46: 415–425.
- **Robbins GK, De Gruttola V, Shafer RW, Smeaton LM, Snyder SW, Pettinelli C, Dubé MP, Fischl MA, Pollard RB, Delapenha R, Gedeon L, van der Horst C, Murphy RL, Becker MI, D'Aquila RT, Vella S, Merigan TC, Hirsch MS; AIDS Clinical Trials Group 384 Team.** Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2003 Dec 11; 349(24):2293-303.
- **Ross AC, Leong T, Avery A, Castillo-Duran M, Bonilla H, Lebrecht D, Walker UA, Storer N, Labbato D, Khaitan A, Tomanova-Soltys I, McComsey GA.** Effects of in utero antiretroviral exposure on mitochondrial DNA levels, mitochondrial function and oxidative stress. *HIV Med*. 2012 Feb;13(2):98-106.
- **Rylova SN, Mirzaee S, Albertioni F, Eriksson S.** Expression of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in mouse tissues: implications for mitochondrial toxicity. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jun 30;74(1):169-75.
- **Shafer RW, Smeaton LM, Robbins GK, De Gruttola V, Snyder SW,**

- D'Aquila RT, Johnson VA, Morse GD, Nokta MA, Martinez AI, Gripshover BM, Kaul P, Haubrich R, Swingle M, McCarty SD, Vella S, Hirsch MS, Merigan TC; AIDS Clinical Trials Group 384 Team.** Comparison of four-drug regimens and pairs of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2003 Dec 11;349(24):2304-15.
- **Shaunak S, Bartlett JA.** Zidovudine-induced neutropenia: are we too cautious? *Lancet*. 1989 Jul;2(8654):91-2
  - **Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, Stryker R, Johnson P, Labriola DF, Farina D, Manion DJ, Ruiz NM.** Efavirenz plus AZT and 3TC, efavirenz plus IDV, and IDV plus AZT and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med* 1999 Dec 16;341(25):1865-73.
  - **Sternfeld T, Lorenz A, Schmid M, Schlamp A, Demmelmair H, Koletzko B, Bogner JR.** Increased red cell corpuscular volume and hepatic mitochondrial function in NRTI-treated HIV infected patients. *Curr HIV Res*. 2009 May;7(3):336-9.
  - **Sternfeld T, Schmid M, Tischleder A, Mudra S, Schlamp A, Kost BP, Gruber R, Youle M, Bogner JR, Goebel FD.** The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells. *Antivir Ther*. 2007;12(5):769-78.
  - **Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE.** Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with HIV and the role of Hepatitis C or B infection. *JAMA* 2000; 283: 74-80
  - **Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, Fauci AS, Orenstein JM.** Gp120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD14 cells prepared from lymph nodes of HIV-infected individuals: an immunoelectron microscopic study. *AIDS* 1997; 11:27-32.
  - **Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Hirsch MS, et al.** The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987 Jul;317(4):192-7
  - **UNAIDS.** Update of global and regional data to reflect 2011 estimates. <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublic>

ation/2011/JC2225\_UNAIDS\_datatables\_en.pdf

- **UNAIDS** AIDS at 30: Nations at the crossroads; 2011. <http://www.unaids.org/en/resources/publications/2011/name,60139,en.asp>
- **UNAIDS**. Core Slides: Global Summary of the AIDS Epidemic. 2012; <http://de.slideshare.net/UNAIDS/2012-unaids-epidemiology-slides>
- **UNAIDS**. Report on the Global AIDS Epidemic; 2012. 2 UNAIDS. Together We Will End AIDS. 2012; <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>
- **Vinogradov SV, Poluektova LY, Makarov E, Gerson T, Senanayake MT**. Nano-NRTIs: efficient inhibitors of HIV type-1 in macrophages with a reduced mitochondrial toxicity. *Antivir Chem Chemother*. 2010 Oct 28;21(1):1-14.
- **Vittecoq D, Jardel C, Barthélémy C, Escaut L, Cheminot N, Chapin S, Sternberg D, Maisonneuve T, Lombès A**. Mitochondrial damage associated with long-term antiretroviral treatment: associated alteration or causal disorder? *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Nov 1;31(3):299-308.
- **Walker UA, Bickel M, Lütke-Volksbeck SI**. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor-associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:117-121.
- **Walker UA, Venhoff N**. Uridine in the prevention and treatment of NRTI-related mitochondrial toxicity. *Antivir Ther*. 2005;10 Suppl 2:M117-23
- **Walmsley S, Bernstein B, King M, Arribas J, Beall G, Ruane P, Johnson M, Johnson D, Lalonde R, Japour A, Brun S, Sun E; M98-863 Study Team**. Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med* 2002 Jun 27; 346(26):2039- 46.
- **White AJ**. Mitochondrial toxicity and HIV therapy. *Sex Transm Infect*. 2001 Jun;77(3):158-73.
- **WHO**. Tuberculosis and HIV: <http://www.who.int/hiv/topics/tb/en/index.html>.
- **WHO**. Tuberculosis: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html).
- **Yeni P, Cooper DA, Aboulker JP, Babiker AG, Carey D, Darbyshire JH, Floridia M, Girard PM, Goodall RL, Hooker MH, Mijch A, Meiffredy V, Salzberger B**. Virological and immunological outcomes at 3 years after starting antiretroviral therapy with regimens containing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, PI, or both in INITIO: open-label randomised trial. *Lancet* 2006 Jul 22;368(9532):287-98

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

3TC-	Lamivudine (2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine)
as-	antisense
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
ARC	Aids related complex
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin, Zidovudine
BBB	Bluthirnschranke
CCOI	Cytochrom C Oxidase Untereinheit I
CD	Cluster of Differentiation
CK	Creatinkinase CMV Zytomegalie Virus
COX	Cytochrom c Oxidase
DAIG	Deutsche AIDS Gesellschaft e.V.
d4T	Stavudine (didehydro-deoxythymidine)
dCK	cytosolische Deoxycytidine-Kinase
DDC	Didesoxycytosin
DDI	Didesoxyinosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEXA	Dual Energie X-Ray Absorptionsmetrie
dGK	Deoxyguanosine kinase
5'dNT	5'-deoxynucleotidases
dNTPs	deoxynucleotide Triphosphates
EDTA-	Ethylendiamintetraessigsäure
EM-Bild-	Elektronenmikroskopisches Bild
FAD	Flavin-Adenin-dinukleotid
gB	Glykoprotein-B
gp	Glykoproteinkomplex
GSH	Glutathione
GTP	Guanosine triphosphate
HAART	highly active anti retroviral therapy
H-ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IDV	Indinavir
LA	Lipoatrophie
LAC	L-acetylcarnitine
LAS	Lymphadenopathy syndrome
LC	Liquid crystal
LD	Lipodystrophie

MCV	Mean Corpuscular Volume
MD	mitochondriale Dysfunktion
MDMs	Monozyten-derived Makrophagen
mtDNA	mitochondriale DNA
mie	Major immediate early Gen
MSM	Männer die Sex mit Männern haben
MW	Mittelwert
MZI	Mehrzweckinstitut
NAC	N-acetyl-cysteine
NADH	Nicotinamid-Adenin-dinukleotid
NAM	Nicotinamid
NNRTI	nicht nucleosidische Hemmstoffe
NRTI	nucleosidische Hemmstoffe
1gNRTIs	nucleosidische Hemmstoffe der 1. Generation
2gNRTIs	nucleosidische Hemmstoffe der 2. Generation
NW	Nebenwirkungen
OGTT	oraler Glucosetoleranztest
OXPHOS	oxidative Phosphorylation
PBLmd	Blutlymphozytenprozentzahl mit mitochondrialer Dysfunktion
PCR	polymerase chain reaction
p. A.	pro analysis
PI	protease inhibitor
PNP	Polyneuropathie
PPAR gamma	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTPC	Permeabilitäts Transitions Poren Complex
PTP	Permeabilität -Übergangs Pore
ROS	reactive oxygen species
Rpm	rotations per minute
RKI	Robert Koch Institut
RRF	Ragged Red Fibres
RT	Reverse Transkriptase
s	sense
SD	Standardabweichung
SFV1	Simian Foamy Virus Type 1
SIV	Simian (Affen) Immundefizienzviren
SREBP1	Sterol regulatory element binding protein
TK1	Thymidine-kinase
TK2	mitochondriale Thymidine-kinase
WBC	white blood cells
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6. 2.Zusammenfassung

**Hintergrund.** Das humane Immundefizienzvirus (HIV) ruft persistierende Infektionen hervor, die unbehandelt nach unterschiedlich langer Latenzzeit zur AIDS-Erkrankung und zum Tode führen. In den letzten Jahrzehnten wurden zunehmend bessere Therapieschemata entwickelt, die die Vermehrung von HIV unterbinden, das Virus aber nicht vollständig aus dem Organismus entfernen können. Daher ist eine Dauertherapie nötig.

Hauptkomponenten aller Therapien sind **nukleos/tidische Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase** (abgekürzt NRTI). Einige dieser Inhibitoren hemmen auch die DNS-Polymerase  $\gamma$  der zellulären Mitochondrien und bewirken dort eine Abnahme sowie Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA), die ihrerseits zu Funktionsausfällen führen. Nach mehreren Monaten Therapie können sich bei einem Teil der Patienten lebensbedrohliche Stoffwechselstörungen zeigen, z. B. eine Übersäuerung des Bluts mit Laktat, aber auch irreversible Schäden besonders in Muskel-, Fett- und Nervengewebe.

**Fragestellung.** Ziel der Arbeit war es, eine Methode zur genauen Messung des mtDNA-Gehalts pro Zelle zu entwickeln und diese Methode zur Verlaufsbeobachtung bei 90 HIV-Patienten einer multizentrischen Studie unter 3 verschiedenen Therapie-Regimen einzusetzen. Dies sollte eine frühzeitige Erkennung der Mitochondrienschäden ermöglichen, bevor klinische Symptome auftreten und einen Therapiewechsel veranlassen. Daneben sollte auch geprüft werden, ob im Serum und den PBMC der Patienten das Cytomegalovirus (CMV) nachweisbar war, da dieses ein bekannter opportunistischer Krankheitserreger bei HIV-Patienten ist.

**Methoden und Patienten.** Als Untersuchungsmaterial dienten periphere monozytäre Blutzellen (PBMC) der Patienten zum Zeitpunkt 0, 24, und 48 Wochen. Die DNA wurde aus diesen Proben extrahiert und ihr Gehalt an mtDNA sowie einer zellkernständigen DNA (nDNA, hier des H-ras Gens) durch eine quantitative PCR im LightCycler System (Roche Diagnostics) gemessen. Das Verhältnis mt/nDNA sollte ein Maß für die Schädigung der Mitochondrien sein. Auch die Menge des CMV wurde mit dieser Methode bestimmt. Es standen entgegen dem ursprünglichen Plan aber nur 35 PMBC Proben von 13 Patienten zur Verfügung, da die Studie weit vor der Zeit abgebrochen wurde. Daneben wurden die PBMC von 8 gesunden Probanden untersucht.

**Ergebnisse.** Im Vergleich zu den 8 gesunden Kontrollpersonen mit  $642 \pm 275$  mtDNA Kopien pro Zelle war bei 5 HIV-Patienten zu Therapiebeginn der Wert höher (Höchstwert 2627), bei dreien niedriger (niedrigster Wert 114); MW. und Standardabweichung waren  $949 \pm 750$ , was einen ähnlichen MW. aber eine signifikant höhere Streubreite bei den Patienten belegt. Die mtDNA zeigte bei den 4

Patienten, bei denen ausreichende Daten vorlagen, keine Beziehung zur HI-Viruslast. Dies war aber nicht zu erwarten, da unter Therapie alle Patienten HIV RNA negativ waren.

Unter Therapie ergab sich wiederum ein sehr heterogenes Bild: Bei 3 Patienten nahm die mtDNA stetig ab, bei 2 Patienten gab es zu Monat 12 eine Zunahme, dann eine Abnahme, bei zweien eine stetige Zunahme und bei einem keine wesentliche Änderung. Tendenziell sieht es so aus, dass die mtDNA Anzahl vor Therapiebeginn bei einigen Patienten schon durch den HIV-Befall an sich beeinträchtigt ist, sich dann nach Therapiebeginn etwas erholt, jedoch letztendlich durch die ART-verursachte Toxizität bei 5 Patienten deutlich weiter herabfällt. In keinem Fall unterschieden sich die höchsten und niedrigsten Werte eines Verlaufs um mehr als 2,25, meist war es deutlich weniger. Dies galt auch für die 2 Patienten, die nach Schema A mit den besonders toxischen Medikamenten (D4T, 3TC,) behandelt wurden und für die jeweils 2 Werte vorlagen. Wegen der geringen Fallzahl ließ sich keine sinnvolle Zuordnung zu den verschiedenen Therapie-Regimen vornehmen. Fünf von 8 Patienten waren vor Therapie CMV-DNA positiv und wurden dann negativ. Ein Patient war jedoch zu Beginn negativ und wurde dann positiv.

**Diskussion.** Zu Beginn der Arbeit im August 2004 erschien das Projekt sehr aussichtsreich, jedoch erwies sich diese Einschätzung als falsch. Die Methodik selbst war anspruchsvoll, aber machbar und ausreichend genau. Die Studie wurde jedoch wegen der medizinisch indizierten Verwendung weniger toxischer Mittel abgebrochen. Retrospektiv muss dies nicht bedauert werden. Die Sichtung der Literatur im Jahr 2012 zu diesem Thema zeigt, dass sehr viele Forscher in den vergangenen 8 Jahren die gleiche Fragestellung aufgegriffen haben, zum Teil sehr umfangreiche Kollektive mit ähnlicher Methodik untersucht haben und dennoch äußerst heterogene Ergebnisse berichten. Bei kritischer Bewertung aus heutiger Sicht kristallisiert sich heraus, dass PBMCs kein geeignetes Material für diese Fragestellung sind, weil die Menge der mtDNA pro Zelle keinen klaren Bezug zu den Funktionsausfällen zeigt, sondern eher die Aktivität und Genauigkeit der mitochondrialen Gen-Expression. Diese komplexen Zusammenhänge machen es verständlich, dass die mtDNA Menge in PBMCs auch keinen klaren Bezug zu den klinisch beobachteten Nebenwirkungen der NRTI-Therapie haben kann. Dazu kommt noch, dass HIV selbst durch Förderung der Apoptoseneigung eine Vorschädigung der mtDNA bewirken kann und in der Therapiephase dann möglicherweise die mitochondriale Toxizität der NRTI noch erhöht. Mit dieser Sichtweise erscheinen die Ergebnisse der Dissertation plausibel. Wegen der zu geringen Fallzahl war jedoch kein klärender Beitrag zur Literatur möglich.

### 6.3 Summary

**Background.** The human immunodeficiency virus causes persistent infections which if not treated, after variable latent periods lead to the clinical picture of the fatal AIDS disease.

In the last decades steadily improved schemes of therapy were developed, which inhibit the replication of the virus but do not eradicate the virus from the human body, which makes the continuous therapy mandatory.

The main components of such therapies are nucleoside/nucleotide inhibitors of the viral reverse transcriptase (NRTI). Some of these inhibitors also inhibit the DNA-polymerase  $\gamma$  of the cellular mitochondria, which decreases and damages the mitochondrial DNA (mtDNA) with subsequent mitochondrial failure.

After some months of therapy some patients develop life threatening metabolic disorders including acidosis and lactic acidosis, moreover an irreversible damage of the muscle, fat and nervous tissue can occur.

**Objective.** The target of this study was to develop a method for an accurate measurement of the cellular mtDNA amount and to use that method for follow-up of 90 patients of a multicentre study receiving three different therapeutic regimes. The results should enable an early preclinical detection of any mitochondrial damage indicating a change of the current therapy. Furthermore, CMV, a well-known opportunistic infection of HIV-patients, should be determined in the serum and the peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

**Method and patients.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the patients were examined after 0, 24 and 48 weeks of treatment. The DNA of these cells was extracted and its contents of the mtDNA along with nuclear DNA (nDNA, here the H-ras gene) were measured through a quantitative PCR using the LightCycler System (Roche Diagnostics). The proportion mt/nDNA was used as a measure of the mitochondrial damage. The amount of the CMV was also measured by the same method. Contrary to the original plan, there were only 35 PBMCs of 13 patients to be examined as the study has been prematurely discontinued. PBMC of 8 healthy candidates were examined as well.

**Results.** In comparison to the 8 healthy candidates with  $642 \pm 245$  mtDNA copies per cell, there was a higher value in 5 HIV-patients at the beginning of the therapy (highest value 2627), and a lower in 3 patients (lowest value 114). Mean value and standard deviation were  $949 \pm 750$  which is corresponding to the mean value in the healthy controls but the standard deviation was significantly larger in the patients. The mtDNA of the 4 patients with sufficient data, showed no correlation to the viral load. This is not unexpected as during the therapy all patient were HIV RNA negative.

The effects of treatment were heterogeneous: three patients showed a continuous decrease of the mtDNA, two patients showed an increase on month 12, followed by a

decrease, two other patients showed a continuous increase and in one patient no significant change could be seen. Apparently, some patients have a decreased mtDNA in PBMC due to the HIV infection even before the beginning of the treatment, which can improve after starting the therapy and eventually decrease because of the ART caused toxicity, which was noticed in five patients. The differences between the highest and lowest values were in all cases below 2.25, mostly much lower. This was also true for the two patients, who were treated according to scheme A with the particular toxic medicaments (D4T, 3TC). Due to the limited number of cases no meaningful correlation to the different regimens of therapy could be achieved.

Five of eight patients were CMV DNA positive before therapy and became negative during the treatment. One patient was CMV DNA negative and became positive during the treatment.

**Discussion:** At the beginning of the study in August 2004 the project looked promising, however this proved untrue. The methods were sophisticated, but feasible and sufficiently accurate. However, the study was discontinued because of the application of less toxic substances. In retrospect, this is actually not to be regretted. A review of the literature for this topic in 2012 revealed that so many researchers in the last eight years considered this topic with large patient cohorts and similar methods but reported utmost heterogenous results. According to today`s knowledge a critical assessment reveals that PBMCs are unsuitable materials for this subject, as the amount of the mtDNA per cell does not correlate visibly to the functional deficits of the cell, but rather the activity and the accuracy of the mitochondrial gene expression. These complex relations may explain the finding that the amount of the mtDNA in PBMCs has no visible correlation to the clinically noticed side effects of the NRTI-therapy. Moreover the HIV itself promotes the apoptosis and hence causes a predamage of the mtDNA which in turn increases the NRTI-toxicity of the mitochondria during the therapy. The results of this doctoral dissertation seem then to be plausible from this point of view. Due to the small number of cases a relevant addition to the literature could not be achieved.

#### **6.4 Erklärung gemäß §11 (6) der Promotionsordnung des FB Medizin der JLU Gießen**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Christina Yassa geb. Michael

## **6.5 Lebenslauf**

## **6.6 Danksagung**

Das Thema der Arbeit wurde von Herrn Dr. Christian Schüttler, Institut für Medizinische Virologie der JLU und Herrn Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer, Medizinische Klinik 2 der JLU formuliert. Bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeit erhielt ich Unterstützung von den Herrn Dr. Tilo Jonas und Dr. Schüttler. Die Interpretation der Daten und die Abfassung der Dissertationsarbeit wurde von Dr. Schüttler und vor allem von Prof. Dr. Wolfram Gerlich betreut. Allen Beteiligten danke ich für diese Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Medizinstudiums und der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Ohne ihren stetigen Zuspruch, ihre Hilfe und motivierenden Einfluss hätte ich diese Arbeit nicht bewältigen können.